



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/20455</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月13日(13.04.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05366</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月30日(30.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/279535 1998年10月1日(01.10.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 渡辺卓也(WATANABE, Takuya)[JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-404号 Ibaraki, (JP)</p> <p>寺尾寧子(TERAOKA, Yasuko)[JP/JP] 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地-307号 Ibaraki, (JP)</p> <p>松井英起(MATSUI, Hideki)[JP/JP] 〒305-0044 茨城県つくば市並木4丁目16番地1-708号 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHI, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA</p> <p>(57) Abstract A novel human-derived G protein-coupled receptor protein or a peptide fragment thereof; a nucleic acid encoding this receptor protein and its derivative, etc. The G protein-coupled receptor protein derived from human hippocampus or the nucleic acid encoding the same and its derivative are usable in determining a ligand (agonist) to the above G protein-coupled receptor protein, as preventives and/or remedies for diseases in association with the malfunction of the above G protein-coupled receptor protein, as gene diagnostics, in screening a compound capable of changing the expression dose of the receptor protein or its peptide fragment, etc.</p>		

本発明はヒト由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質をコードする核酸およびその誘導体などに関する。

本発明のヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードする核酸及びその誘導体は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、遺伝子診断剤、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法などに用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

5 技術分野

本発明は、ヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAに関する。

背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein(以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、
- 15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7TMR)と総称される。

- G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセ
- 20 プターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。
- 25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内に

は未だ未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質にいてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

- 5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

- 10 近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

- 15 従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従
- 20 って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

- 25 しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。また、これらオーファンレセプターを用い、そのシグナル伝達を指標として、そ

れらに対応するリガンドを見出す試みにより新規なホルモンや生理活性物質が見出された例〔S. Hinuma *et al.* Nature, 393:272-276(1998); T. Sakurai *et al.* Cell, 92:573-585 (1998); J. C. Meunier *et al.* Nature, 377 (6549) 532-535 (1995)〕もあるが、まだその数が少ないことから明らかなとおり容易なこと

5 ではない。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（即ち、リガンド）の探索、また該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニスト）の探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

15 さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子
20 治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

25 発明の開示

本発明は、上記のように有用なヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。即ち、ヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RN

- Aおよびそれらの誘導体)を含有するポリヌクレオチド(DNA、RNAおよびそれらの誘導体)、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を
- 5 変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを
- 10 用いて得られるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。
- 15 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、degenerated PCR法によって作成したEST情報に基づいて、ヒト由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7
- 20 回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
- 25 アミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
- (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列である前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

- (3) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (4) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 5 (5) DNAである前記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (6) 配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を有する前記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (7) 前記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- (8) 前記(7)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- 10 (9) 前記(8)記載の形質転換体を培養し、前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
- (10) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- 15 (11) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である前記(10)記載の抗体、
- (12) 前記(10)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (13) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、
- 20 (14) 前記(13)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを含有してなる医薬、
- (15) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- 25 (16) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (17) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 5 (18) 前記(16)記載のスクリーニング方法または前記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、
- (19) 前記(16)記載のスクリーニング方法または前記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- 10 (20) 前記(4)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- 15 (21) 前記(4)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列およびその一部を含有してなるポリヌクレオチド、
- (22) 前記(4)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法、
- 20 (23) 前記(10)記載の抗体を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法、
- (24) 前記(22)または前記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能が関連する疾患の診断方法、
- 25 (25) 前記(22)記載の定量方法を用いることを特徴とする、前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (26) 前記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜における前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物

またはその塩のスクリーニング方法、

(27) 前記(25)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、

- 5 (28) 前記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜における前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩などに関する。

さらには、

- (29) 蛋白質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1
10 で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配
15 列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

- 20 (30) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(15)記載のリガンドの決定方法、

- (31) リガンドが例えばアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、
25 オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、

ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、
5 MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである上記(30)記載のリガンドの決定方法、

(32) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接
10 触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記(16)記載のスクリーニング方法、

(33) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩
15 に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上
20 記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(34) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび
25 試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の

スクリーニング方法、

(35) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(36) (i) 標識したリガンドを上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(37) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(38) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化

- する化合物および試験化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 5 （３９）上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである上記（３７）または（３８）記載のスクリーニング方法、
- 15 （４０）上記（３２）～（３９）記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、
- 20 （４１）上記（３２）～上記（３９）記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
- 25 （４２）上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（１７）記載のスクリーニング用キット、

(43) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(17)記載のスクリーニング用キット、

(44) 上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記(17)記載のスクリーニング用キット、

(45) 上記(42)～(44)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

10 (46) 上記(42)～(44)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(47) 上記(10)記載の抗体と、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記(1)のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

(48) 上記(10)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

25 (49) 被検液と担体上に不溶化した上記(10)記載の抗体および標識化された上記(10)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

図面の簡単な説明

図1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列をもとに作成した、本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。

- 5 図2は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質とMASのアミノ酸配列の相同性比較を示す。図中、上段が本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質、下段がMASのアミノ酸配列を示す。

発明の実施をするための最良の形態

- 10 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列等）を含有するレセプター蛋白質である。

- 15 本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、
- 20 巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳
- 25 染、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

- 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 10 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質として、より具体的には、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

- 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 20 リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

- また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））

のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：
5 1 で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、
10 ル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルと
15 して汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

20 さらに、本発明のレセプタータンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、
25 イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1 で表わ

されるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト海馬由来）のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドで
5 あれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、図1で示される疎水性プロット解析において細
10 胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、
15 より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

20 ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～
25 20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）

またはカルボキシレート ($-\text{COO}^-$) であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド ($-\text{CONH}_2$) またはエステル ($-\text{COOR}$) であってもよい。

- さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と
- 5 同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)
- 10 またはカルボキシレート ($-\text{COO}^-$) であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド ($-\text{CONH}_2$) またはエステル ($-\text{COOR}$) であってもよい。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される
- 15 酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 20 本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 25 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそ

のアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-
5 ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知
10 の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種
15 活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいは
20 はHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メ
25 チルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが

用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を
5 行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオ
10 キシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、
15 シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボ
20 ニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ
25 る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、 $\text{Cl}_2\text{-Bzl}$ 、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-

2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、
- 5 2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd 黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般
- 15 に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除
- 20 去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。
- 25

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末

- 端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

- タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

- 本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部

分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

- 本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

- 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

- 具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列と約70以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以

上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)を、クローン化したあるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド(核酸)は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質

共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及びG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、

- メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 20 本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で
- 25 好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al.,

Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、
- 5 結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホス
- 10 ホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'
- 15 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。
- 20 アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

- 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分
- 25 ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、

前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

- 具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
- 5 (1) 配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。
- 10

- 配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA
- 15 などが用いられる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ
- 20 DNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。
- 25

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-G(宝酒造(株))、MutanTM-K(宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモ

ーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクレック・アシズ・リサーチ,（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology）〕, 120巻, 517（1978）〕, HB101〔ジャーナル・オブ・

モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N CYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、
15 *Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

20 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン

(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 5 酵母を形質転換するには、例えば、メツソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 10 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 15 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

- 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。
- 20
- 25

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in

Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約53~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding

of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 5 以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、
10 超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。
15

- このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリ
20 クリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 25 かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当

な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 5 かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を
10 認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってよい。

- 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造
15 法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して
20 抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 25 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋

白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

5 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに
15 に吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリド
20 ーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育
25 種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、

好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

5 (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等の
15 抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合
20 体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプル
25 させる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるい

は担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

- 5 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうこと

- 10 ができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、

- (1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、(3) 遺伝子診断剤、(4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法、(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、(8) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(12) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による
- 15
20
25

中和、（13）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

- 特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な
- 5 G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を变化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

- 本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。
- 10

- 15 （1）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

- 20 すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

- 試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、C
- 25

GRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パ
ンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アド
レナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO
 α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、G
5 CP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、M
IP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒス
タミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまた
はガラニンなど)の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、マウス、ラ
ット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用
10 いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋
白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガ
ンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もし
くはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター
15 蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用い
ることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性 (例えば、
アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP
生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞
内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性また
20 は抑制する活性)を有する化合物 (例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性
化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはそ
の部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋
白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性など
25 を測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本
発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験
化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対

する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または
5 該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質または
10 はその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内c
15 GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触
20 させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑
25 制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発

明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、

5 該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに

10 属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

15

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

20

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

25

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モ

チリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティ
ッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、
トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン
(chemokine)（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-
5 2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、
MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、
エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、
パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決
10 定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細
胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター
標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）の
リン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白
質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的
15 結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス
社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミン
やゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プ
ロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイ
ペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ
20 阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、
一定量（5000cpm~500000cpm）の[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（N
SB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意
する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分か
25 ら24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙
等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放
射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。
全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）
が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対

するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

25 Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

- 5 市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

- 10 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液
15 を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

- ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチ
20 レーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシスト
25 キニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティ

ナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーテッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。

- 10 (2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤

上記(1)の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない(該レセプター蛋白質の欠乏症)患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、②(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。即ち、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一種であるMASとアミノ酸配列レベルで約30%の相同性が認められる。MAS遺伝子

- 欠損マウスに不安の昂進等の中枢機能の変化が認められたとの報告〔J. B. C., 273 (No. 19), 11867-11873 (1998)〕があることから、MAS遺伝子は中枢機能発現に何らかのはたらきがあると考えられる。従って、MASと相同性が認められる本発明のレセプター蛋白質は、中枢機能の不全に関連する疾患（例えば、
- 5 不安症、分裂病、躁鬱病、痴呆症、精神遅滞および運動障害を包含する精神病など）の予防および／または治療に有用である。ラットのMAS遺伝子の発現が生後直後に末梢の種々の臓器で高い発現を示し、成熟後は中枢以外では精巣で高い発現を示すとの報告[FEBS Lett. 357:27-32 (1995)]があることから、細胞の増殖・機能の獲得および生殖に重要な役割があると考えられる。従って、MASと相同性が認められる本発明のレセプター蛋白質は、呼吸器疾患・循環器疾患・消化管疾患・肝/胆/膵疾患・内分泌疾患の予防および／または治療に有用である。
- 10

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

- 15 一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、その
- 20 ままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

- 例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。
- 25

これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。
- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方

法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

(3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），

第86巻、2766～2770頁（1989年）などにより実施することができる。

（4）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

- 5 本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち本発明は、例えば、（i）非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または（ii）形質転換体等に含まれる
- 10 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

- 15 （i）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間
- 20 経過した後、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

- 得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えばTaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の
- 25 手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、
- 10 細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。
- 15

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、
- 20
- （ロ）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。
- 25

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）に
15 おいては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ま
20 くは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（5）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何
25 らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防およ

び／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外
5 外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造
10 することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル
15 ルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイ
20 プの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ
25 ンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ

カインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)に
10 においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好まし
15 くは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

 本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

- 20 本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

- 25 ①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

- ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法

 本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質

等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- 5 このような化合物には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の
- 10 レセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、
- 15 上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明

20 のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

- 25 より具体的には、本発明は、
- ①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との

結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 5 ③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 10 ④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、
- 15 アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- 20 ⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜
- 25

上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、
5 pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなど
10 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際に
15 スクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることが
20 ができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて
25 大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、

本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を
5 宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、
10 SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P.ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定
20 化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠

心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによ

- るレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4} M~ 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - NSB$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - NSB$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。
- 15 リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。
- 20

- 具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォ
- 25

ルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

- 本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

- 本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5% CO_2 、95% airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [^3H]、[^{125}I]、[^{14}C]、[^{35}S]などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- 5 ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。
- ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識リガンドを5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく。
- 10 ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。
- ④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式で求める。
- 15

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

20 NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性
- 25 を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する

- 化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。
- 5

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。
- 10

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

- リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。
- 15

- リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。
- 20

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。
- 25

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法な

- どにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その
- 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、
- 5 例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

- （8）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化
- 10 させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

- 本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／
- 15 または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

- 20 例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に
- 25 認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セ

- ルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプ
- 5 プの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ
- 10 ンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジ
- 15 ルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防

20 止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、

例えば、注射剤の形では通常成人（60 kg として）においては、一日につき約0.01～30 mg 程度、好ましくは約0.1～20 mg 程度、より好ましくは約0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

5 (9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例
10 例えば、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性
15 を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供する。

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

20 本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測
25 定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメ

トリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、
5 例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物
10 質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる
15 方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反
20 応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

25 また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白

質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

- 5 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定
- 10 量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

- イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化
- 15 抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

- また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、
- 20 生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

- これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の
- 25 条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」

(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)
(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)
(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods
in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol.
5 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical
Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part
D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part
E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol.
121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal
10 Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照)。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明
20 のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセ
25 プター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明

のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

- (iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

- 細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面

活性剤（例えば、トリトンX100TM、ツイーン20TMなど）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500

10 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、

15 例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は前述の方法と同様に行なうことができ、ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

20

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

（i）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、

25

好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、
- 5 一定時間培養後(1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

- 10 (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間
- 15 経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜に
- 20 おける本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞
- 25 膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生

成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを増強させる化合物、(ロ)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ

- ンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、
- 5 ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。
- 10

- このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。
- 15

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その
- 20 1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 25 （12）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体が、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、即ち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従っ

て、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。従って、該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

5 (13) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギ
15 などが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させる
20 うる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。
25

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する

ことを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。

- 5 さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

- 10 本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

- 本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような
15 医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。また
25 アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン

	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
5	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
10	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
15	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
20	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
25	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン

- Pro : プロリン
- Asn : アスパラギン
- Gln : グルタミン
- pGlu : ピログルタミン酸
- 5 Me : メチル基
- Et : エチル基
- Bu : ブチル基
- Ph : フェニル基
- TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
- 10 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。
- Tos : p-トルエンスルフォニル
- CHO : ホルミル
- 15 Bzl : ベンジル
- Cl₂Bzl : 2, 6-ジクロロベンジル
- Bom : ベンジルオキシメチル
- Z : ベンジルオキシカルボニル
- Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
- 20 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
- Boc : t-ブトキシカルボニル
- DNP : ジニトロフェノール
- Trt : トリチル
- Bum : t-ブトキシメチル
- 25 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
- HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
- HOObt : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
1, 2, 3-ベンゾトリアジン
- HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

DCC : N、N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

5 本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213の
アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213V
のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

10 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

15 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213VをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

20 本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213をコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213をコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー2の塩基配列を示す。

25 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH5 α /pCRII-hHI7T213は、平成10年9月4日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERMBP-6484として、平成10年6月19日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16187として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

5 実施例1 ヒト由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト海馬cDNA (Marathon-Ready™ cDNA, CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 5) およびプライマー2 (配列番号: 6) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1 (配列番号: 5) およびプライマー2 (配列番号: 6) を各0.2 μM、dNTPs 200 μM、および酵素に添付のバッファを加え、25 μlの液量とした。PCR反応は、① 95℃・1分の後、② 94℃・20秒、72℃・2分のサイクルを3回、③ 94℃・20秒、68℃・2分のサイクルを3回、④ 94℃・20秒、63.5℃・20秒、68℃・2分20秒のサイクルを38回繰り返し、⑤ 最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCRII (Invitrogen社) へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする2種のcDNA配列 (配列番号: 3および配列番号: 4) を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 1および配列番号: 2) のうち
10 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhHI7T213と命名し、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhHI7T213Vと命名した。
15 20 25

本発明のヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質hHI7T213

をコードする cDNA (配列番号: 3) がサブクローニングされたプラスミド pCRII-hHI7T213 を、自体公知の方法に従い大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α に導入して、形質転換体: 大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α /pCRII-hHI7T213 を得た。

5

実施例 2 hHI7T213 発現 CHO 細胞の作製

実施例 1 で作製した形質転換体 *E. coli* DH5 α /pCRII-hHI7T213 を培養後、プラスミド・ミドキット (キアゲン社) を用いて pCRII-hHI7T213 のプラスミド DNA を調製した。このプラスミドから本

10 発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hHI7T213 をコードする cDNA をタンパク発現用プラスミドベクター pcDNA3.1/V5/His α へクローニングしてタンパク発現用プラスミド pcDNA3.1-hHI7T213 を構築した。このようにして得たプラスミドは、プラスミド・ミドキット (キアゲン社) を用いて大量にプラスミド DNA を調製した後、これをセルフエクト・トランスフェクションキット

15 (アマシャムファルマシアバイオテック社) を用い添付のプロトコールに従って CHO dhfr $^{-}$ 細胞に導入した。すなわち、10mg の DNA をリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24 時間前に 5×10^5 または 1×10^6 個の CHO dhfr $^{-}$ 細胞を播種した 10 cm シャーレに添加した後、10% ウシ胎児血清を含む MEM α 培地で 1 日間培養し、継代した後、選択培地である 0.4mg/ml の G418 (ギブコ

20 BRL 社) および 10% 透析ウシ胎児血清を含む MEM α 培地で培養した。選択培地中で増殖してくる形質転換細胞 (CHO/hHI7T213) のコロニーを選択することにより、hHI7T213 発現 CHO 細胞とした。

選択した hHI7T213 発現 CHO 細胞から常法に従い全 RNA を抽出した後、TaqMan 法により hHI7T213 の mRNA 量を測定・コピー数を算出した。

25 結果を下表に示す。

表 1

クローンNo.	発現量 (コピー/ng 全RNA)	
	1回目測定	2回目測定
8	4780	8145
	10916	8956
12	44105	67482
	47085	65845
13	16663	20810
	18033	20404

産業上の利用可能性

- 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは
- 5 その塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド (例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体) は、①リガンド (アゴニスト) の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプター
 - 10 との比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
3. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
- 10 4. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を有する請求項4記載のポリヌクレオチド。
- 15 7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
- 20 10. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
11. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項10記載の抗体。
- 25 12. 請求項10記載の抗体を含有してなる診断薬。
13. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。
14. 請求項13記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを含有し

てなる医薬。

15. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

- 5 16. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 10 17. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 15 18. 請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

19. 請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 20 20. 請求項4記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

21. 請求項4記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列およびその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

- 25 22. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法。

23. 請求項10記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法。

24. 請求項22または請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能が関連する疾患の診断方

法。

25. 請求項22記載の定量方法を用いることを特徴とする、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 5 26. 請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

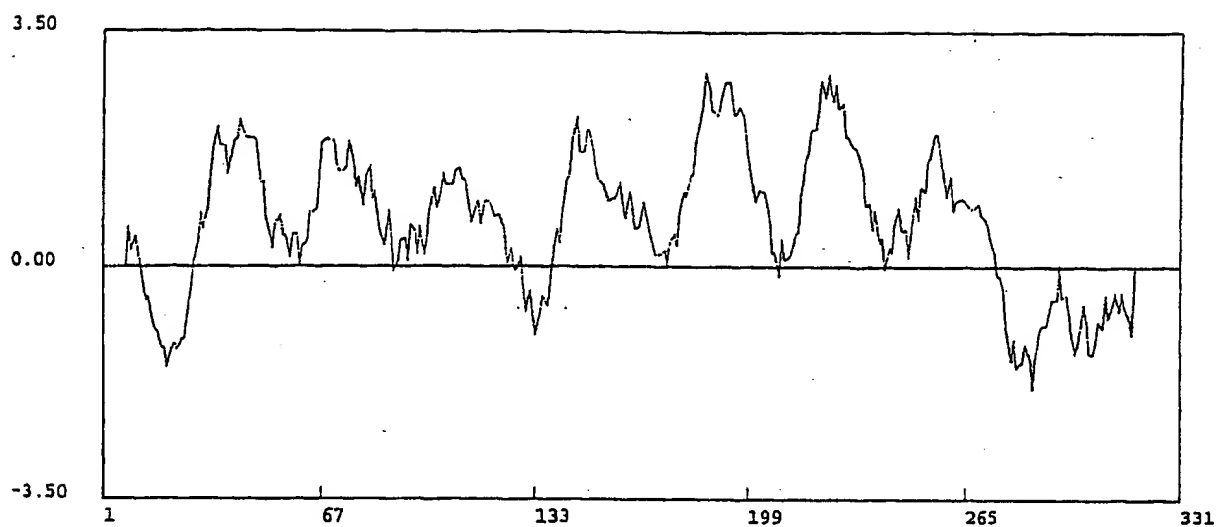
27. 請求項25記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

10

28. 請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩。

☒ 1

Parameter : Kyte & Doolittle
Range to Average : 15



☒ 2

37 VSLVALTGNVVLWLLGCRMRRNAVSIIYILNLVAADFLFLSGHII CS... 83
:| :::: |:|:|:| | | | | ::| | :| | | :| | :| |
41 ISPLGFVENGILLWFLCFMRMRNPFTVYITHLSIADISLLFCIFILSIDY 90
84 .. PLRLINIRHPISKILSPVMTFPYFIGLSMLSAISTERCLSILWPIWYH 131
:| : :: | | :: | | | | :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
91 ALDYELSSGHYYTIVTLSVTFLFGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYPIWYR 140
132 CRRPRYLSSVMCVLLWALSLLRSILEWMFCDFLFGADSVWCETSD... 177
|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
141 CHRPKHQSAFVCALLWALSCLVTTMEYVMC.. IDSGEES.. HSQSDCRAV 186
178 .. FITI. AWLVFLCVVLCGSSLVLLVRILCGSRKMPLTRLYVTILLTVLV 224
- |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
187 IIFIAILSFLVFTPLMLV. SSTILVVKIRKNTWASHSSKLYIVIMVTIII 235
225 FLLCGLPFGIQWALFSRIHLDWKVLFCHVHLVSIFLSALNSSANPIIYFF 274
|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
236 FLIFAMPMRVLYLLYYEY... WST. FGNLHNISLLFSTINSSANPFIYFF 281
275 VGSFRQRQRQNLKLVLRALQD.. TPEVDEGGG 306
| | | :::: |:|:|:| | | :| | :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
282 VGSSKKKRFRESLKVVLTAFKDEMQRREQENG 315

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G-Protein Coupled Receptor Protein and its DNA

<130> A98152

<150> JP 10-279535

<151> 1998-10-01

<160> 6

<210> 1

<211> 322

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asp Ser Thr Ile Pro Val Leu Gly Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn

5

10

15

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Gly

20

25

30

Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Ala Leu Thr Gly Asn Ala Val Val

35

40

45

Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr

50

55

60

Ile Leu Asn Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly His Ile

65

70

75

80

Ile Cys Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Arg His Pro Ile Ser Lys

85

90

95

Ile Leu Ser Pro Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Met

100

105

110

Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Ile Leu Trp Pro Ile

115

120

125

2/6

Trp Tyr His Cys Arg Arg Pro Arg Tyr Leu Ser Ser Val Met Cys Val
 130 135 140
 Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Phe
 145 150 155 160
 Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Val Trp Cys Glu Thr Ser
 165 170 175
 Asp Phe Ile Thr Ile Ala Trp Leu Val Phe Leu Cys Val Val Leu Cys
 180 185 190
 Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys
 195 200 205
 Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val
 210 215 220
 Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser
 225 230 235 240
 Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val
 245 250 255
 Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr
 260 265 270
 Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys
 275 280 285
 Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly
 290 295 300
 Gly Gly Trp Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Gln
 322
 <210> 2
 <211> 322
 <212> PRT

3/6

<213> Human

<400> 2

Met	Asp	Ser	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn
				5					10					15	
Gly	Arg	Glu	Glu	Thr	Pro	Cys	Tyr	Lys	Gln	Thr	Leu	Ser	Phe	Thr	Gly
				20				25					30		
Leu	Thr	Cys	Ile	Val	Ser	Leu	Val	Ala	Leu	Thr	Gly	Asn	Ala	Val	Val
			35				40					45			
Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Cys	Arg	Met	Arg	Arg	Asn	Ala	Val	Ser	Ile	Tyr
			50				55					60			
Ile	Leu	Asn	Leu	Val	Ala	Ala	Asp	Phe	Leu	Phe	Leu	Ser	Gly	His	Ile
65					70					75				80	
Ile	Cys	Ser	Pro	Leu	Arg	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	His	Pro	Ile	Ser	Lys
				85					90					95	
Ile	Leu	Ser	Pro	Val	Met	Thr	Phe	Pro	Tyr	Phe	Ile	Gly	Leu	Ser	Met
				100					105					110	
Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Thr	Glu	Arg	Cys	Leu	Ser	Ile	Leu	Trp	Pro	Ile
				115					120					125	
Trp	Tyr	His	Cys	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ser	Val	Met	Cys	Val
				130					135					140	
Leu	Leu	Trp	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Glu	Trp	Met	Phe
145					150					155				160	
Cys	Asp	Phe	Leu	Phe	Ser	Gly	Ala	Asn	Ser	Val	Trp	Cys	Glu	Thr	Ser
				165					170					175	
Asp	Phe	Ile	Thr	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Phe	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Cys
				180					185					190	
Gly	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Leu	Cys	Gly	Ser	Arg	Lys
				195					200					205	

4/6

Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val

210

215

220

Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser

225

230

235

240

Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val

245

250

255

Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr

260

265

270

Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys

275

280

285

Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly

290

295

300

Gly Gly Trp Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu

305

310

315

320

Glu Gln

322

<210> 3

<211> 969

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

ATGGATTCAA CCATCCCAGT CTTGGGTACA GAACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60
 ACTCCTTGCT ACAAGCAGAC CCTGAGCTTC ACGGGGCTGA CGTGCACTCGT TTCCCTTGTC 120
 GCGCTGACAG GAAACGCGGT TGTGCTCTGG CTCCTGGGCT GCCGCATGCG CAGGAACGCT 180
 GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGTCGCG GCCGACTTCC TCTTCCTTAG CGGCCACATT 240
 ATATGTTTCG CGTTACGCCT CATCAATATC CGCCATCCCA TCTCCAAAAT CCTCAGTCCT 300
 GTGATGACCT TTCCCTACTT TATAGGCCTA AGCATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGCGC 360
 TGCCTGTCCA TCCTGTGGCC CATCTGGTAC CACTGCCGCC GCCCAGATA CCTGTCATCG 420
 GTCATGTGTG TCCTGCTCTG GGCCCTGTCC CTGCTCGGGA GTATCCTGGA GTGGATGTTT 480

5/6

TGTGACTTCC TGTTTAGTGG TGCTGATTCT GTTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATTACA 540
ATCGCGTGGC TGGTTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGGGT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600
AGGATTCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTCCTC 660
ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGTGGCCTG CCCTTTGGCA TTCAGTGGGC CCTGTTTTCC 720
AGGATCCACC TGGATTGGAA AGTCTTATTT TGTCATGTGC ATCTAGTTTC CATTTTCCTG 780
TCCGCTCTTA ACAGCAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTAGGCAG 840
CGTCAAATA GGCAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CACGCCTGAG 900
GTGGATGAAG GTGGAGGGTG GCTTCCTCAG GAAACCCTGG AGCTGTCGGG AAGCAGATTG 960
GAGCAGTGA 969

<210> 4

<211> 969

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

ATGGATTCAA CCATCCCAGT CTTGGGTACA GAACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60
ACTCCTTGCT ACAAGCAGAC CCTGAGCTTC ACGGGGCTGA CGTGCATCGT TTCCCTTGTC 120
GCGCTGACAG GAAACGCGGT TGTGCTCTGG CTCCTGGGCT GCCGCATGCG CAGGAACGCT 180
GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGTCGCG GCCGACTTCC TCTTCCTTAG CGGCCACATT 240
ATATGTTGCG CGTTACGCCT CATCAATATC CGCCATCCCA TCTCCAAAAT CCTCAGTCCT 300
GTGATGACCT TTCCCTACTT TATAGGCCTA AGCATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGCGC 360
TGCCTGTCCA TCCTGTGGCC CATCTGGTAC CACTGCCGCC GCCCCAGATA CCTGTCATCG 420
GTCATGTGTG TCCTGTCTG GGCCTGTCC CTGCTGCGGA GTATCCTGGA GTGGATGTTT 480
TGTGACTTCC TGTTTAGTGG TGCTAATTCT GTTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATTACA 540
ATCGCGTGGC TGGTTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGGGT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600
AGGATTCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTCCTC 660
ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGTGGCCTG CCCTTTGGCA TTCAGTGGGC CCTGTTTTCC 720
AGGATCCACC TGGATTGGAA AGTCTTATTT TGTCATGTGC ATCTAGTTTC CATTTTCCTG 780
TCCGCTCTTA ACAGCAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTAGGCAG 840
CGTCAAATA GGCAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CACGCCTGAG 900

6/6

GTGGATGAAG GTGGAGGGTG GCTTCCTCAG GAAACCCTGG AGCTGTCGGG AAGCAGATTG 960
GAGCAGTGA 969

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

GTCGACATGG ATTCAACCAT CCCAGTCTTG 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

ACTAGTTCAC TGCTCCAATC TGCTTCCCGA 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50,
A61K 45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50,
A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-146192, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 02 June, 1998 (02.06.98) & WO, 9724436, A2 & EP, 870020, A2	1-28
A	JP, 9-278798, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 October, 1997 (28.10.97) & EP, 789076, A2	1-28
A	JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 September, 1997 (16.09.97) (Family: none)	1-28
A	JP, 9-70289, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 18 March, 1997 (18.03.97) (Family: none)	1-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 December, 1999 (10.12.99)

Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶

C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶

C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-146192, A (武田薬品工業株式会社) 2. 6月. 1998 (02. 06. 98) & WO, 9724436, A2 & EP, 870020, A2	1-28
A	JP, 9-278798, A (武田薬品工業株式会社) 28. 10月. 1997 (28. 10. 97) & EP, 789076, A2	1-28
A	JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16. 9月. 1997 (16. 09. 97) ファミリーなし	1-28
A	JP, 9-70289, A (武田薬品工業株式会社) 18. 3月. 1997 (18. 03. 97) ファミリーなし	1-28

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 12. 99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 118 620 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

25.07.2001 Bulletin 2001/30

(51) Int Cl.7: **C07K 14/475, C12N 15/12,
C12P 21/02, C07K 16/28,
G01N 33/50, A61K 45/00**

(21) Application number: **99969942.4**

(22) Date of filing: **30.09.1999**

(86) International application number:
PCT/JP99/05366

(87) International publication number:
WO 00/20455 (13.04.2000 Gazette 2000/15)

(84) Designated Contracting States:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**

Designated Extension States:

AL LT LV MK RO SI

• **TERAO, Yasuko**

Tsukuba-shi Ibaraki 305-0034 (JP)

• **MATSUI, Hideki**

Tsukuba-shi Ibaraki 305-0044 (JP)

(30) Priority: **01.10.1998 JP 27953598**

(71) Applicant: **Takeda Chemical Industries, Ltd.**
Osaka-shi, Osaka 541-0045 (JP)

(74) Representative: **Keller, Günter, Dr. et al**
Lederer, Keller & Riederer
Patentanwälte
Prinzregentenstrasse 16
80538 München (DE)

(72) Inventors:

• **WATANABE, Takuya**

Tsukuba-shi Ibaraki 305-0821 (JP)

(54) **NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF**

(57) The present invention relates to a human-derived G protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, and nucleic acid encoding the receptor protein or a derivative thereof.

The present human hippocampus-derived G protein coupled receptor protein or nucleic acid encoding the protein and a derivative thereof can be used for de-

termining a ligand (agonist) for the present G protein coupled receptor protein, an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient functions of the present G protein coupled receptor protein, a gene therapeutic, and a method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof to be expressed.

Description

Technical Field

5 [0001] The present invention relates to a human-derived novel G protein coupled receptor protein or a salt thereof and a DNA encoding it.

Background Art

10 [0002] Physiologically active substances such as many hormones and neurotransmitters regulate the function of the living body through specific receptor proteins present in a cell membrane. Since many of these receptor proteins conduct intracellular signal transmission through activation of coupled guanine nucleotide-binding protein (hereinafter abbreviated as G protein in some cases) and have the common structure having 7 transmembrane regions, they are called collectively as G protein coupled receptor protein or 7 times transmembrane type receptor protein (7 TMR).

15 [0003] The G protein coupled receptor protein is present on the surfaces of the cells and various functional cells of organs of the living body and plays on a physiologically important role as a target for a molecule which regulates the functions of those cells and organs, for example, hormones, neurotransmitters and physiologically active substances. A receptor transmits a signal into a cell through binding with a physiologically active substance, and a variety of reactions such as activation and inhibition of a cell are induced by this signal.

20 [0004] Elucidation of the relationship of a substance which regulates the complex function of cells and organs of a variety of living bodies and a specific receptor therefor, in particular, a G protein coupled receptor protein elucidates the function of cells and organs of a variety of living bodies, and provides a very important means for developing drugs which are closely associated with the functions.

25 [0005] For example, in a variety of organs of the living body, the physiological regulation is conducted under regulation by many hormones, hormone-like substances, neurotransmitters or physiologically active substances. In particular, physiologically active substances are present in various sites in the living body, and regulate their physiological function through receptor proteins, each corresponding thereto. There are still unknown hormones and neurotransmitters and other physiologically active substances in the living body, many of which have not been reported yet regarding the structures of these receptor proteins. Further, whether or not a subtype is present is not known in many of the known
30 receptor proteins.

[0006] Revelation of the relationship between a substance which regulates the complex function in the living body and a specific receptor protein therefor is a very important means for developing medicines. In addition, in order to effectively screen an agonist and an antagonist for receptor proteins and develop medicines, it is necessary to elucidate the function of a gene of a receptor protein expressed in the living body and express it in a suitable expression system.

35 [0007] Recently, as a means for analyzing a gene expressed in the living body, studies of analyzing randomly a sequence of a cDNA are actively conducted, and the thus obtained sequences of cDNA fragments are registered in database as Expressed Sequence Tag (EST) are published. However, many ESTs contain only sequence information and it is difficult to presume their functions.

40 [0008] Previously, a substance which inhibits binding of a G protein coupled receptor and a physiologically active substance (that is, ligand) and a substance which causes the same signal transmission as that for a physiologically active substance (that is, ligand) by binding have been utilized as a medicine for regulating the functions of the living body as a specific antagonist or agonist for these receptors. Therefore, new finding of a G protein coupled receptor protein which is not only important in the physiological manifestation in the living body but also as a target for drug development, and cloning of the gene (for example, cDNA) are a very important means upon finding of a specific ligand,
45 an agonist and an antagonist for a novel G protein coupled receptor protein.

[0009] However, not all of G protein coupled receptors have been found and, even at present, there are still many unknown G protein coupled receptors, and so called orphan receptors for which corresponding ligands have not been identified, and there are desired search of new G protein coupled receptors and elucidation of their functions. In addition, there are examples where new hormones or physiologically active substances were found by using these orphan
50 receptors and trying to find ligands corresponding to them using its signal transmission as an index [S. Hinuma et al., Nature, 393:272-276 (1998); T. Sakurai et al. Cell, 92:573-585 (1998); J. C. Meunier et al., Nature, 377(6549) 532-535 (1995)]. However, as apparent from the fact that the above examples are still a small number, the above trying is not easy.

[0010] A G protein coupled receptor is useful for searching a new physiologically active substance (that is, ligand)
55 using its signal transmission action as an index, or searching an agonist or antagonist for the receptor. On the other hand, even when a physiological ligand has not been found, an agonist or an antagonist to the receptor can be prepared by analyzing the physiological action of the receptor from an inactivation experiment of the receptor (knockout animal). A ligand, an agonist or an antagonist for these receptors can be expected to be utilized as an agent for preventing/

treating or diagnosing diseases associated with the insufficient function of a G protein coupled receptor.

[0011] Further, there are many cases where reduction or exasperation of the function of the receptor in the living body based on a gene mutation of a G protein coupled receptor is a cause for some diseases. In this case, there can be applied to gene therapy by not only administration of an antagonist or an agonist for receptor but also introduction of the receptor gene into the living body (or a particular organ) and introduction of an antisense nucleic acid for the receptor gene. In this case, a base sequence of the receptor is essential information for examining the presence or absence of deletion or mutation on a gene and the receptor gene can be applied to an agent for preventing/treating or diagnosing diseases associated with the insufficient function of the receptor.

Disclosure of Invention

[0012] The present invention provides a human being-derived novel G protein coupled receptor protein which is useful as described above. That is, the present invention provides a human being-derived novel G protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, a polynucleotide (DNA, RNA and their derivatives) comprising a polynucleotide (DNA, RNA and their derivatives) encoding the G protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof, a recombinant vector comprising polynucleotide, a transformant harboring the recombinant vector, a process for producing the G protein coupled receptor protein or a salt thereof, an antibody to the G protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein to be expressed, a method for determining a ligand for the G protein coupled receptor, a method for screening a compound (antagonist, agonist) or a salt thereof which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein, a kit for the screening, a compound (antagonist, agonist) which alters binding of a ligand obtained by using the screening method or screening kit and the G protein coupled receptor protein or the salt thereof, and a medicine comprising a compound (antagonist, agonist) or a salt thereof which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein and a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein to be expressed.

[0013] The present inventors studied intensively and, as a result, we isolated a cDNA encoding a human being-derived novel G protein coupled receptor protein based on EST information made by a degenerated PCR method, and succeeded in analyzing its entire base sequence. And when this base sequence was translated into an amino acid sequence, the first to seventh transmembrane regions were confirmed on hydrophobic plot, and proteins encoding by these cDNAs were confirmed to be 7 times transmembrane type G protein coupled receptor protein. The present inventors further studied on these findings and, which resulted in completion of the present invention.

[0014] That is, the present invention provides:

- (1) a G protein coupled receptor protein which comprises an amino acid sequence identical or substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 or a salt thereof,
- (2) the G protein coupled receptor protein according to the above (1), wherein the amino acid sequence substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 is an amino acid sequence represented by SEQ ID No:2 or a salt thereof,
- (3) a partial peptide of the G protein coupled receptor protein according to above (1) or a salt thereof,
- (4) a polynucleotide which comprises a polynucleotide having a base sequence encoding the G protein coupled receptor protein according to the above (1),
- (5) the polynucleotide according to the above (4), which is a DNA,
- (6) the polynucleotide according to the above (4), which has a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4,
- (7) a recombinant vector which comprises the polynucleotide according the above (4),
- (8) a transformant transformed with the recombinant vector according to the above (7),
- (9) a method for producing the G protein coupled receptor protein or a salt thereof, which comprises culturing a transformant according to the above (8) to produce the G protein coupled receptor protein according to the above (1),
- (10) an antibody to the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof,
- (11) the antibody according to the above (10), which is a neutralizing antibody which inactivates signal transmission of the G protein coupled receptor protein according to the above (1),
- (12) a diagnostic agent which comprises the antibody according to the above (10),
- (13) a ligand for the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or a salt thereof, which is obtainable by using the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof,
- (14) a medicine which comprises the ligand for the G protein coupled receptor protein according to the above (13),

(15) a method for determining a ligand for the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or a salt thereof, which comprises using the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof,

(16) a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or a salt thereof, which comprises using the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof,

(17) a kit for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which comprises the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof,

(18) a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or a salt thereof, which is obtainable by using the method for screening according to the above (16) or the kit for screening according to the above (17),

(19) a medicine which comprises a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which is obtainable by the method for screening according to the above (16) or the kit for screening according to the above (17),

(20) a polynucleotide which hybridizes with the polynucleotide according to the above (4) under the highly stringent conditions,

(21) a polynucleotide which comprises a base sequence complementary to the polynucleotide according to the above (4) or a part thereof,

(22) a method for quantitating a mRNA for the G protein coupled receptor protein according to the above (1), which comprises using the polynucleotide according to the above (4) or a part thereof,

(23) a method for quantitating the G protein coupled receptor protein according to the above (1), which comprises using the antibody according to the above (10),

(24) a method for diagnosing diseases associated with the function of the G protein coupled receptor according to the above (1), which comprises using the quantitating method according to the above (22) or the above (23),

(25) a method for screening a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor according to the above (1) to be expressed, or a salt thereof, which comprises using the method for quantitating according to the above (22),

(26) a method for screening a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or a salt thereof in a cell membrane, which comprises using the method for quantitating according to the above (23),

(27) a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or a salt thereof, which is obtainable by using the method for screening according to the above (25),

(28) a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or a salt thereof in a cell membrane, which is obtainable by using the method for screening according to the above (26), and so forth.

Further, the present invention provides:

(29) the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), wherein the protein is a protein comprising (a) an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1, an amino acid sequence in which 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 30, more preferably around 1 to 9, more preferably a few (1 to 5) amino acids in an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 are deleted, (b) an amino acid sequence in which 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 30, more preferably around 1 to 10, more preferably a few (1 to 5)) amino acids are added to an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1, (c) an amino acid sequence in which 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 30, more preferably around 1 to 10, more preferably a few (1 to 5)) amino acids in an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 are substituted with other amino acids, or (d) an amino acid of a combination of them,

(30) a method for determining the ligand according to the above (15), which comprises contacting the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3), with a test compound,

(31) the method for determining a ligand according to the above (30), wherein a ligand is, for example, angiotensin, bombesin, cannabinoids, cholecystokinin, glutamine, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene related peptide), leukotriene, pancreastatin, prostaglandin, thromboxane, adenosine, adrenaline, α and β -chemokine (for example, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, 1-309, MIP1 α , MIP-1 β , RANTES), endothelin, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin,

(32) the method for screening according to the above (16), which comprises comparing (i) the case where the G

protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3) is contacted with a ligand, with (ii) the case where the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3) is contacted with a ligand and a test compound,

(33) a method for screening a compound which alters binding of a ligand and the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which comprises measuring and comparing an amount of a labeled ligand for the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3) in (i) the case where a labeled ligand is contacted with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3), and (ii) the case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3),

(34) a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which comprises measuring and comparing an amount of a labeled ligand to a cell comprising the G protein coupled receptor protein according to the above (1) in (i) the case where a labeled ligand is contacted with the cell, and (ii) the case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the cell,

(35) a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which comprises measuring and comparing an amount of a labeled ligand to a membrane fraction of the cell comprising the G protein coupled receptor protein according to the above (1) in (i) the case where a labeled ligand is contacted with the membrane fraction of the cell, and (ii) case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the membrane fraction of the cell,

(36) a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or a salt thereof, which comprises measuring and comparing an amount of binding of a labeled ligand for the G protein coupled receptor protein in (i) where a labeled ligand is contacted with the G protein coupled receptor protein expressed on a cell membrane of a transformant according to the above (8) by culturing the transformant, and (ii) case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the G protein coupled receptor protein expressed on a cell membrane of a transformant according to the above (8) by culturing the transformant,

(37) a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which comprises measuring and comparing the cell stimulating activity via the G protein coupled receptor protein in (i) the case where a compound which activates the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) with a cell comprising the G protein coupled receptor protein according to the above (1), and (ii) the case where a compound which activates the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) and a test compound are contacted with a cell comprising the G protein coupled receptor protein according to the above (1),

(38) a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which comprises measuring and comparing the cell stimulating activity via the G protein coupled receptor protein in the case where a compound which activates the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) is contacted with the G protein coupled receptor protein expressed on a cell membrane of a transformant according to the above (8) by culturing the transformant, and the case where a compound which activates the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) and a test compound are contacted with the G protein coupled receptor protein expressed on a cell membrane of a transformant according to the above (8) by culturing the transformant,

(39) the method for screening according to the above (37) or the above (38), wherein the compound which activates the G protein coupled receptor protein according to the above (1) is angiotensin, bombesin, canabinoide, cholecystokinin, glutamine, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene related peptide), leukotriene, pancreastatin, prostaglandin, thromboxane, adenosine, adrenaline, α and β -chemokine (for example, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 α , MIP-1 β , RANTES), endothelin, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin,

(40) a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which is obtainable by the method for screening according to the above (32) to (39),

(41) a medicine which comprises a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which is obtainable by the method for screening according to the above (32) to (39),

(42) the kit for screening according to the above (17), which comprises a cell comprising the G protein coupled receptor protein according to the above (1),

(43) the kit for screening according to the above (17), which comprises a membrane fraction of a cell comprising the G protein coupled receptor protein according to the above (1),

5 (44) the kit for screening according to the above (17), which comprises the G protein coupled receptor protein expressed on a cell membrane of a transformant according to the above (8) by culturing the transformant,

(45) a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which is obtainable by the kit for screening according to the above (42) to (44),

10 (46) a medicine which comprises a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1), or a salt thereof, which is obtainable by the kit for screening according to the above (42) to (44),

(47) a method for quantitating the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to the above (1) or the partial peptide or a salt thereof according to the above (3), which comprises contacting the antibody according to the above (10), with the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof,

15 (48) a method for quantitating the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof in a test solution, which comprises competitively reacting the antibody according to the above (10), with a test solution and the labeled G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof, and measuring a proportion of the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof bound to the antibody, and

20 (49) a method for quantitating the G protein coupled receptor protein according to the above (1) or the partial peptide according to the above (3) or a salt thereof in a test solution, which comprises reacting simultaneously or successively a test solution with the antibody according to the above (10) insolubilized on a carrier and the labeled antibody according to the above (10), and measuring the activity of a labeling agent on a insolubilized carrier.

Brief Description of Drawings

30 **[0015]** FIG. 1 shows a hydrophobic plot of the present G protein coupled receptor protein, which was made based on an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1.

[0016] FIG. 2 shows comparison of an amino acid sequence of the present G protein coupled receptor protein having an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 with that of MAS. In the FIG.2, an upper row shows an amino acid sequence of the present G protein conjugated protein and a lower row shows an amino acid sequence of MAS.

Best Mode for Carrying Out the Invention

[0017] The present G protein coupled receptor protein (hereinafter referred to as receptor protein in some cases) is a receptor protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 (for example, an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2).

40 **[0018]** The present receptor protein may be a protein derived from cells (e.g., hepatic cells, spleen cells, nerve cells, glia cells, pancreatic β -cells, bone marrow cells, mesangial cells, Langerhans' cells, epidermal cells, epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, fibrous cells, muscular cells, fat cells, immune cells (e.g., macrophage, T cell, B cell, natural killer cell, mast cell, neutrophils, basophils, eosinophils, monocyte), megakaryocyte, synovial membrane cells, soft-bone cells, bone cells, osteoblast, osteoclast, mammary gland cells or interstitial cells, or their precursor cells, stem cells or cancer cells) or any tissues having such cells, for example, brain and each site of brain (e.g., olfactory bulb, tonsil nuclei, cerebral basal bulb, hippocampus, thalamus, hypothalamus, cerebral cortex, medulla bulb, cerebellum), spinal cord, pituitary, stomach, pancreas, kidney, liver, gonads, thyroid glands, galls, bone marrow, adrenals, skin, muscles, lungs, digestive tracts (e.g., large and small intestines), bloodvessels, heart, thymus, spleen, salivary glands, peripheral blood, prostate, testicles, ovary, placenta, uterus, bone, cartilage, joints, skeletal muscles from humans or warm-blooded-animals (e.g., guinea pig, rat, mouse, chicken, rabbit, pig, sheep, cow, monkey etc.), as well as a recombinant protein or a synthetic protein.

50 **[0019]** Examples of an amino acid sequence substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 include an amino acid sequence having about 50% or more, preferably about 70% or more, more preferably about 80% or more, more preferably about 90% or more, most preferably about 95% or more homology with an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1.

[0020] The protein of the present invention comprising an amino acid sequence substantially identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 is preferably, for example, a protein having an amino acid sequence

substantially identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and having substantially homogeneous properties with those of a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[0021] The protein of the present invention comprising an amino acid sequence substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1, is more particularly a protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No:2.

[0022] The substantially homogeneous properties indicate, for example include the ligand binding activity and the signal information transmission action. The terms "substantially homogeneous" mean that those activities are qualitatively homogeneous. Therefore, although it is preferable that the activities such as the ligand binding activity and the signal information transmission action are equal (for example, about 0.01 to 100-fold, preferably about 0.5 to 20-fold, more preferably about 0.5 to 2-fold), quantitative elements such as a degree of these activities and a molecular weight may be different.

[0023] Measurement of the ligand binding activity and the signal information transmission action can be according to the per se known method, for example, by the ligand determining method and screening method described later.

[0024] In addition, as the receptor protein of the present invention, a protein comprising (a) an amino acid sequence in which 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 30, more preferably around 1 to 10, further preferably a few (1 to 5)) amino acids in an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 are deleted, (b) an amino acid sequence in which 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 30, more preferably around 1 to 10, further preferably a few (1 to 5)) amino acids are added to an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1, (c) an amino acid sequence in which 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 30, more preferably around 1 to 10, further preferably a few (1 to 5)) amino acids in an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 are substituted with other amino acids, or (d) an amino acid of a combination of them, and the like is used.

[0025] In receptor proteins in the present specification, a left end is a N-terminal (amino terminal) and a right end is a C-terminal (carboxyl terminal) according to the convention of the peptide display. Although present proteins including a protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 have usually carboxyl group (-COOH) or carboxylate (-COO⁻) as a C-terminal, they may have an amide (-CONH₂) or an ester (-COOR) as a C-terminal.

[0026] As R in ester, for example, C₁₋₆ alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl and n-butyl, C₃₋₈ cycloalkyl group such as cyclopentyl and cyclohexyl, C₆₋₁₂ aryl group such as phenyl and α -naphthyl, C₇₋₁₄ aralkyl group such as phenyl-C₁₋₂ alkyl group such as benzyl and phenetyl or α -naphthyl-C₁₋₂ alkyl group such as α -naphthylmethyl, as well as pivaloyloxymethyl group generally used in an oral ester are used.

[0027] When the present receptor protein has carboxyl group (or carboxylate) at a position other than a C-terminal, proteins in which carboxyl group is amidated or esterified are also included in the present receptor protein. As an ester in this case, for examples, an ester at a C-terminal described above is used.

[0028] Further, the present receptor proteins include proteins in which an amino group of a methionine residue of a N-terminal amino acid residue (for example, methionine residue is protected with a protecting group (for example, C₁₋₆ acyl group such as C₁₋₆ alkanoyl such as formyl group and acetyl group) in the aforementioned proteins, proteins in which a N-terminal glutamine residue produced by cutting in the living body is pyroglutamine-oxidized, proteins in which a substituent (such as -OH, -SH, amino group, imidazole group, indole group, guanidino group) on a side chain of an intramolecular amino acid is protected with a suitable protecting group (C₁₋₆ acyl group such as C₁₋₆ alkanoyl group such as formyl group and acetyl group), and conjugated proteins such as glycoprotein having sugar chains bound thereto.

[0029] As an embodiment of the present receptor protein, for example, a human being-derived (more preferably, human being hippocampus-derived) receptor protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 is used.

[0030] As a partial peptide of the present receptor protein (hereinafter abbreviated as partial peptide in some cases), any partial peptides are used as long as they are a partial peptide of the aforementioned receptor protein. For example, among the present receptor protein molecules, a partial peptide which is exposed outside a cell membrane and has the receptor binding activity is used.

[0031] More specifically, as a partial peptide of a receptor protein having an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1, there is a peptide comprising a part analyzed to an extracellular region (hydrophilic site) in a hydrophobic plot analysis shown in FIG. 1. In addition, a peptide comprising a hydrophobic site as its part may be also used. Although peptides comprising individual domains separately may be used, peptides of a part comprising simultaneously a plurality of domains may be used.

[0032] It is preferable that the number of amino acids of the present partial peptide is at least 20 or more, preferably 50 or more, more preferably 100 or more among component amino acid sequence of the aforementioned present receptor protein.

[0033] Substantially same amino acid sequence denotes an amino acid sequence having about 50% or more, preferably about 70% or more, more preferably about 80% or more, further preferably about 90% or more, most preferably about 95% or more homology with these amino acid sequences.

[0034] Here, the terms "substantially homogeneous properties" have the same meanings as defined above. Measurement of "substantially homogeneous properties" can be performed as described above.

[0035] In addition, in the present partial peptide, 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 10, more preferably a few (1 to 5)) amino acids in the aforementioned amino acid sequence may be deleted, or 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 20, more preferably around 1 to 10, further preferably a few (1 to 5)) amino acids may be added to the amino acid sequence, or 1 or 2 or more (preferably, around 1 to 20, more preferably 1 to 10, further preferably a few (1 to 5)) amino acids may be substituted with other amino acids.

[0036] In addition, the present partial peptide has usually a carboxyl group (-COOH) or carboxylate (-COO⁻) as a C-terminal. However, a C-terminal may be amido (-CONH₂) or an ester (-COOR) as in the present protein.

[0037] Further, partial peptides in which an amino group of a methionine group of a N-terminal is protected with a protecting group, partial peptides in which a N-terminal is cut in the living body and the produced Gln is pyroglutamine-oxidized, partial peptides in which a substituent on a side chain of an intramolecular amino acid is protected with a suitable protecting group, or a conjugated peptide in which a sugar chain is bound, such as so-called glycopeptide are included in the present peptide, as in the aforementioned present receptor protein.

[0038] In addition, although the present partial peptide has usually a carboxyl group (-COOH) or carboxylate (-COO⁻) as a C-terminal, a C-terminal may be an amido (-CONH₂) or an ester (-COOR) as in the aforementioned present protein.

[0039] Examples of salts of the receptor protein or partial peptide of the present invention include salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids, organic acids) or bases (e.g., alkali metal salts), and preferably physiologically acceptable acid addition salts. Such salts include, for example, salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid) or salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid).

[0040] The present receptor protein or a salt thereof can be prepared from cells or tissues of a human being and a warm blood mammal described above by the method of purifying proteins known per se, or can be prepared by culturing a transformant comprising a DNA encoding a protein described later. Alternatively, it can be prepared according to a method of synthesizing a peptide described later.

[0041] For production from human or mammalian tissues or cells, the human or mammalian tissues or cells are homogenized and then extracted with e.g. an acid, and the extract can be subjected to purification and isolation by a combination of chromatographic techniques such as reverse-phase chromatography, ion-exchange chromatography etc.

[0042] For synthesis of the receptor protein or partial peptide of the present invention or a salt thereof or amide derivatives thereof, usually commercially available resin for protein synthesis can be used. Such resin includes, for example, chloromethyl resin, hydroxymethyl resin, benzhydryl amine resin, aminomethyl resin, 4-benzyloxybenzyl alcohol resin, 4-methylbenzhydryl amine resin, PAM resin, 4-hydroxymethylmethylphenylacetamidemethyl resin, polyacrylamide resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-hydroxymethyl) phenoxy resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc aminoethyl) phenoxy resin, and so forth. On the resin described above, each amino acid with the α -amino group and side-chain functional group properly protected is condensed sequentially in accordance with the sequence of the desired protein by the per se known condensation methods. At the end of the reaction, the protein is cleaved off from the resin while various protecting groups are removed, and the product is subjected to a reaction of forming intramolecular disulfide bonds in a highly dilute solution to give the desired protein or an amide thereof.

[0043] A wide variety of activating reagents usable for protein synthesis can be used for condensation of the protected amino acids described above, and carbodiimides are particularly preferable. Examples of such carbodiimides include DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, etc. For activation by these reagents, the protected amino acids along with racemization inhibitors (e.g., HOBt, HOObt) can be added to the resin directly or after the protected amino acids were previously activated as symmetric acid anhydrides or HOBt esters or HOObt esters.

[0044] The solvent used for activation of each protected amino acid or for condensation thereof with the resin can be selected as necessary from those solvents known to be usable in protein condensation reaction. Examples of such solvent include acid amides such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide and N-methylpyrrolidone, halogenated hydrocarbons such as methylene chloride and chloroform, alcohols such as trifluoroethanol, sulfoxides such as dimethyl sulfoxide, ethers such as pyridine, dioxane and tetrahydrofuran, nitriles such as acetonitrile and propionitrile, esters such as methyl acetate and ethyl acetate, or a suitable mixture thereof. The reaction temperature is usually selected as necessary within the range known to be usable in the reaction of forming protein bonds, and usually the reaction temperature is selected within the range of about -20 °C to 50 °C. The activated amino acid derivatives are used usually in excess (1.5- to 4-fold). When their condensation is insufficient, their sufficient condensation is achieved as a result of a test using ninhydrin reaction by repeatedly carrying out the condensation reaction without conducting elimination of the protecting groups. When their sufficient condensation is not achieved even by repeatedly carrying out the reaction, the unreacted amino acids are acetylated with acetic anhydride or acetyl imidazole.

[0045] The protecting groups for amino groups in the starting materials include, for example, Z, Boc, t-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulphenyl, diphenylphosphinothiyl, Fmoc etc.

[0046] The carboxyl group can be protected by, for example, alkyl esterification (e.g., straight-chain, branched or cyclic alkyl esterification such as methyl, ethyl, propyl, butyl, t-butyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl or 2-adamantyl esterification), aralkyl esterification (e.g., benzyl esterification, 4-nitrobenzyl esterification, 4-methoxybenzyl esterification, 4-chlorobenzyl esterification, benzhydryl esterification), phenacyl esterification, benzyloxycarbonyl-hydrazidation, t-butoxycarbonylhydrazidation, tritylhydrazidation etc.

[0047] The hydroxyl group in serine can be protected by, for example, esterification or etherification. A suitable group used in this esterification includes, for example, lower alkanoyl groups such as acetyl group, allyl groups such as benzoyl group, and carbonic acid-derived groups such as benzyloxycarbonyl group and ethoxycarbonyl group. A suitable group for etherification includes, for example, a benzyl group, tetrahydropyranyl group, t-butyl group etc.

[0048] The protecting group used for the phenolic hydroxyl group in tyrosine includes, for example, Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, t-butyl etc.

[0049] The protecting group used for imidazole in histidine includes, for example, Tos 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, Fmoc etc.

[0050] Activated carboxyl groups in the starting materials include, for example, the corresponding acid anhydrides, azides and active esters (i.e. esters with alcohols such as pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, p-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinamide, N-hydroxyphthalimide and HOBt). The activated amino groups in the starting materials include, for example, the corresponding phosphoric acid amides.

[0051] Examples of methods for removing (leaving) of the protecting groups include catalytic reduction in a hydrogen stream in the presence of a catalyst such as Pd-black or Pd-carbon, acid treatment using anhydrous hydrogen fluoride, methane sulfonic acid, trifluoromethane sulfonic acid, trifluoroacetic acid or a mixed solution thereof, base treatment using diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine or piperazine, and reduction using sodium in liquid ammonia. The leaving reaction by the acid treatment described above is carried out generally at a temperature of about -20 °C to 40 °C, and it is effective in the acid treatment to add a cation scavenger such as anisole, phenol, thioanisole, m-cresol, p-cresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol and 1,2-ethanedithiol. A 2,4-dinitrophenyl group used as a protecting group for imidazole in histidine can also be removed by treatment with thiophenol, while a formyl group used as a protecting group for indole in tryptophan can be removed not only by deprotection by acid treatment in the presence of 1,2-ethanedithiol or 1,4-butanedithiol, but also by alkali treatment using dilute sodium hydroxide solution or dilute ammonia.

[0052] Protection and protecting groups for functional groups which should not participate in the reaction of the starting materials, elimination of the protecting groups, and activation of functional groups participating in the reaction can be selected as necessary from known groups or known means.

[0053] Another method of obtaining an amide derivative of the protein includes, for example, protecting the α -carboxyl group of a C-terminal amino acid by amidation, then extending a peptide (protein) chain at the side of the amino group until it attains desired chain length, and thereafter producing a protein of said peptide chain from which only the protecting group for the N-terminal α -amino group was removed and a protein of said peptide chain from which only the protecting group for the C-terminal carboxyl group was removed, followed by condensation both the proteins in the mixed solvent as described above. The details of the condensation reaction are the same as described above. The protected protein obtained by condensation is purified, and every protecting group is removed by the method described above, whereby the desired crude protein can be obtained. This crude protein is purified by a wide variety of known purification techniques, and by lyophilizing its major fraction, the desired amide derivative of the protein can be obtained.

[0054] To obtain an ester derivative of the protein, for example the α -carboxyl group of a C-terminal amino acid is condensed with desired alcohol to form an amino acid ester from which the desired ester derivative of the protein can be obtained in the same manner as for the amide derivative of the protein.

[0055] The partial peptide of the present invention or a salt thereof can be produced according to a peptide synthesis per se known method or by cleaving the protein of the present invention with a suitable peptidase. For example, the peptide synthesis method may be the solid- or liquid-phase synthesis method. That is, the desired peptide can be obtained by condensation of a partial peptide or amino acids capable of constituting the partial peptide of the present invention with the remainder, followed by elimination of protecting groups if any from the product. As the known condensation method and the elimination of the protecting groups, mention is made of e.g. the methods described in (1) to (5) below:

- (1) M. Bodansky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publisher, New York (1966);
- (2) Schroeder and Luecke, The Peptide, Academic Press, New York (1965);
- (3) Nobuo Izumiya et al., Basis and Experiments in Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., Ltd. (1975);
- (4) Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara, Biochemical Experimental Course 1, Protein Chemistry IV, 205,

(1977); and

(5) Haruaki Yajima (supervisor), Development of medicines, a second series, vol.14, Peptide Synthesis, Hirokawashoten.

- 5 **[0056]** After the reaction, the partial peptide of the present invention can be isolated and purified by a combination of conventional purification techniques such as solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography and recrystallization. If the partial peptide is obtained in a free form by these methods, the product can be converted into a suitable salt by a known method or its analogous method, or if the partial peptide is obtained in a salt form, it can be converted into a free peptide or other salts by a known method or its analogous method.
- 10 **[0057]** As a polynucleotide encoding the present receptor protein, any polynucleotides (DNA or RNA, preferably DNA) may be used as long as they comprise a base sequence encoding the aforementioned present receptor protein. As the polynucleotide, there are a DNA and a RNA such as a mRNA encoding the present receptor protein, whether double-stranded or single-stranded. In the case of the double-strand, a double-stranded DNA, a double-stranded RNA or a DNA:RNA hybrid may be used. In the case of single-strand, a sense strand (that is, coding strand), or an antisense strand (that is, non-coding strand) may be used.
- 15 **[0058]** As a DNA encoding the present receptor protein, any of a genomic DNA, a genomic DNA library, a cDNA derived from the aforementioned cells or tissues, a cDNA library derived from the aforementioned cells or tissues, and a synthetic DNA may be used. A vector used for a library may be any of bacteriophage, plasmid, cosmid and phagemide. In addition, amplification can be performed directly by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCT method) using total RNA or mRNA fraction prepared from the aforementioned cells or tissues.
- 20 **[0059]** Specifically, as a DNA encoding the present receptor protein, for example, a DNA comprising a base sequence represented by SEQ ID No: 3 or SEQ ID No:4, or any DNAs having a base sequence which hybridizes with a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4 under the highly stringent conditions, and having the substantially homogeneous properties (for example, ligand binding activity and signal information transmission action) as that of the present receptor protein may be used.
- 25 **[0060]** As a DNA which can hybridize with a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4, for example, a DNA comprising a base sequence having about 70% or more, preferably about 80% or more, more preferably about 90% or more, most preferably about 95% or more homology with a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4 is used.
- 30 **[0061]** Hybridization can be carried out according to a per se known method or its analogous method, for example a method described in Molecular Cloning, 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). If a commercial library is used, hybridization can be carried out according to the manufacture's instructions. Preferably, hybridization can be conducted under high stringent conditions.
- 35 **[0062]** The high stringent conditions refer to those conditions under which the concentration of sodium is about 19 to 40 mM, preferably about 19 to 20 mM, and the temperature is about 50 to 70 °C, preferably about 60 to 65 °C. More specifically, as a DNA encoding a receptor protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1, a DNA comprising a base sequence represented by SEQ ID No:3 is used. As a DNA encoding a receptor protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No:2, a DNA comprising a base sequence represented by SEQ ID No:4 is used.
- 40 **[0063]** A polynucleotide comprising a part of a base sequence of a DNA encoding the present receptor protein, or a part of a base sequence complementary with the DNA means not only include a DNA encoding the following present partial peptide but also include RNA.
- 45 **[0064]** According to the present invention, an antisense polynucleotide (nucleic acid) which can inhibit replication or expression of a G protein coupled receptor protein gene can be designed and synthesized based on a base sequence information of a DNA encoding the cloned or determined G protein coupled receptor protein. Such the polynucleotide (nucleic acid) can hybridize with a RNA for a G protein coupled receptor protein gene, can inhibit the synthesis or the functions of the RNA, or can regulate or control expression of a G protein coupled receptor protein gene via interaction with a G protein coupled receptor protein-related RNA. A polynucleotide complementary with a selected sequence of a G protein coupled receptor protein-related RNA, and a polynucleotide which can specifically hybridize with a G protein coupled receptor protein-related RNA are useful for regulating and controlling expression of a G protein coupled receptor protein gene in vivo and in vitro, and useful for treating or diagnosing diseases. A term "correspond" means homologous or complementary with a particular sequence of a nucleotide, a base sequence or nucleic acid including a gene. "Correspond" between a nucleotide, a base sequence or a nucleic acid and a peptide (protein) usually denotes an amino acid of a peptide (protein) under direction induced by a nucleotide (nucleic acid) sequence or its complement.
- 55 Although 5'-terminal hairpin loop, 5'-terminal 6-basepair repeat, 5'-terminal nontranslation region, polypeptide translation initiating codon, protein coding region, ORF translation initiating codon, 3'-terminal nontranslation region, 3'-terminal palindrome region and 3'-terminal hairpin loop can be selected as a preferable subject region, any region in a G protein coupled receptor gene as a subject region.

[0065] The relationship between an end nucleic acid and polynucleotide complementary with at least a part of a subject region, and the relationship between a subject and a polynucleotide which can hybridize therewith can be said to be "antisense". As an antisense polynucleotide, there are a polydeoxynucleotide comprising 2-deoxy-D-ribose, a polydeoxynucleotide comprising D-ribose, other type polynucleotide which is a N-glycoside of a purine or pyrimidine base, or other polymer having a non-nucleotide skeleton (for example, a commercially available protein nucleic acid and synthetic sequence specific nucleic acid polymer) or other polymer comprising a special linkage (provided that, the polymer contains their nucleotide having arrangement permitting base pairing and base attachment found in a DNA and a RNA). They may be a double-stranded DNA, a single-stranded DNA, a double-stranded RNA, a single-stranded RNA, or a DNA:RNA hybrid, a non-modified polynucleotide (or non-modified oligonucleotide) or may have the added known modification, for example, may have a label known in the art, or have a cap, or may be methylated, or may have substitution of 1 or more natural nucleotide with similar nucleotides, or may have intramolecular nucleotide modification, for example, may have non-charged linkage (methylphosphonate, phosphotriester, phosphoramidate, and carbanate), may have a charged linkage or a sulfur-comprising linkage (for example, phosphorothioate and phosphorodithioate), for example, may have a side chain group of a protein (nuclease, a nuclease inhibitor, toxin, antibody, signal peptide, poly-L-lysine) or a sugar (for example, monosaccharide), may have intercalent compound (for example, acridine and psoralen), may contain a chelate compound (for example, metal, radioactive metal, boron, oxidative metal), may contain alkylating agent, or may have a modified linkage, (for example, α anomer type nucleic acid). Here, "nucleoside", "nucleotide" and "nucleic acid" include not only those comprising a purine and pyrimidine base but also those having modified other heterocyclic type base. Such the modified materials may contain methylated purine and pyrimidine, acylated purine and pyrimidine, or other heterocycle. A modified nucleotide and a modified nucleotide may have a modified sugar part and, for example, 1 or more hydroxy groups may be substituted with halogen or an aliphatic group, or converted into a functional group such as ether and amine.

[0066] The present antisense polynucleotide (nucleic acid) is a RNA, a DNA, or a modified nucleic acid (RNA, DNA). Examples of the modified nucleic acid are not limited to but include a sulfur derivative and a thiophosphate derivative of nucleic acid, and modified nucleic acids which are resistant to degradation of polynucleosideamide and oligonucleosideamide. The present antisense nucleic acid can be preferably designed under the following strategy. That is, an antisense nucleic acid in a cell is made to be more stable, the cell permeability of an antisense nucleic acid is enhanced, affinity for a goal sense strand is made to be greater and, if any, toxicity of an antisense nucleic acid is made to be smaller.

[0067] A variety of such the modifications are known in the art. For example, there is a disclosure in G. Kawakami et al., Pharm. Tech. Japan, vol. 8, pp. 247, 1992; vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRS Press, 1993.

[0068] The present antisense nucleic acid may be altered, may contain a modified sugar, a base or a linkage, may be supplied in the special form of a liposome and a microsphere, may be applied by gene therapy, may be given in the addition form. Examples of the antisense nucleic acid which may be used in the addition form include a polycation such as polylysine which neutralizes a charge of phosphate skeleton, and hydrophobic material such as a lipid which enhances the interaction with the cell membrane and increases uptake of nucleic acid (for example, phospholipid and cholesterol). Examples of a preferable lipid to be added include cholesterol and its derivative (for example, cholesteryl chloroformate and cholic acid). These can be attached to a 3'-terminal or a 5'-terminal of nucleic acid and can be attached via a base, a sugar, and an intramolecular nucleoside linkage. An example of other group includes a group for capping and preventing degradation by a nuclease such as exonuclease and RNase. An example of such the group for capping is not limited to but includes a glycol such as a protecting group for a hydroxyl group known in the art including polyethylene glycol, tetraethylene glycol.

[0069] The inhibitory activity of an antisense nucleic acid can be examined by using the present transformant, the present in vivo and in vitro gene expression system, or in vivo and in vitro translation system for a G protein coupled receptor protein. The nucleic acid can be applied to a cell by a variety of per se known methods.

[0070] As a DNA encoding the present partial peptide, any DNAs may be used as long as they contain a base sequence encoding the aforementioned present partial peptides and, in addition, the DNA may be a genomic DNA, a genomic DNA library, a cDNA derived from the aforementioned cells or tissues, a cDNA library derived from the aforementioned cell or tissue, or a synthetic DNA. A vector used in a library may be any of bacteriophage, plasmid, cosmid, and phagemid. In addition, the DNA may be amplified directly by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR method) using a mRNA fraction prepared from the aforementioned cells and tissues.

[0071] More particularly, as a DNA encoding the present partial peptide, for example, (1) a DNA having a partial base sequence of a DNA having a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4, or (2) a DNA having a base sequence which hybridizes with a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4 under the highly stringent conditions, and having a partial base sequence of a DNA encoding a receptor protein having the substantially homogeneous properties (for example, ligand binding activity and signal information transmission action) to that of the present receptor protein peptide are used.

[0072] A DNA which can hybridize with a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4, for example, a DNA comprising a base sequence having about 70% or more, preferably about 80% or more, more preferably about 90% or more, most preferably about 95% or more homology with a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID No:4 is used.

5 [0073] As a means of cloning the DNA encoding completely for the receptor protein and partial peptide of the present (hereinafter abbreviated as present receptor protein in some cases), it is possible to use amplification by the PCR method using synthetic DNA primers having a partial base sequence of the present receptor protein as well as selection by hybridization of the DNA integrated in a suitable vector with a labeled DNA fragment or synthetic DNA encoding for a part or the whole of the present receptor protein. Hybridization can be carried out according to a method described in, for example, Molecular Cloning, 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). If a commercial library is used, hybridization can be carried out according to the manufacture's instructions.

10 [0074] Conversion of DNA into a base sequence can be carried out by a per se known method, for example by the Gapped duplex method or Kunkel method or its analogous method by using PCR or a known kit such as MutantTM-G (Takara Shuzo Co., Ltd.) or MutantTM-K (Takara Shuzo Co., Ltd.).

15 [0075] A DNA encoding a cloned receptor protein can be used as it is or, if desired, by digesting with a restriction enzyme or adding a linker thereto. The DNA may have ATG as a translation initiation codon at the 5'-terminal thereof and TAA, TGA or TAG as a translation termination codon at the 3'-terminal thereof. These translation initiation and termination codons can also be added to the DNA via a suitable synthetic DNA adaptor.

20 [0076] An expression vector for the present receptor can be produced for example by (A) cutting the desired DNA fragment off from the DNA encoding for the protein of the present invention and then (B) ligating said DNA fragment to a region downstream from a promoter in a suitable expression vector.

[0077] The vector used includes E. coli-derived plasmid (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), Bacillus subtilis-derived plasmid (e.g., pUB110, pTP5, pC194), yeast-derived plasmid (e.g., pSH19, pSH15), bacteriophage such as λ -phage, and animal viruses such as retrovirus, vaccinia virus and Baculovirus, as well as pAI-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo etc.

25 [0078] The promoter used in the present invention may be any suitable promoter compatible with a host used for expression of the gene. For example, when animal cells are used as the host, mention is made of SR α promoter, SV40 promoter, HIV-LTR promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter etc.

30 [0079] Among these promoters, CMV (cytomegalovirus) promoter, SR α promoter etc. are preferably used. It is preferable to use trp promoter, lac promoter, recA promoter, λ PL promoter, lpp promoter, T7 promoter etc. for microorganisms of the genus Escherichia as the host, SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter etc. for microorganisms of the genus Bacillus as the host, and PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter etc. for yeasts as the host. When insect cells are used as the host, polyhedron promoter, P10 promoter etc. are preferable.

35 [0080] The expression vector may contain an enhancer, a splicing signal, a poly A-added signal, a selective marker, an SV40 origin of replication (also referred to hereinafter as SV40 ori) etc. in addition to the promoter described above. The selective marker includes, for example, dihydrofolate reductase (also referred to hereinafter as dhfr) gene [methotrexate (MTX) resistance], ampicillin resistance gene (also referred to hereinafter as Amp^r) and neomycin resistance gene (G418 resistance, also referred to hereinafter as Neo^r). In particular, if the dhfr gene is used as a selective marker for dhfr gene-defective Chinese hamster cells, the desired gene can also be selected in a thymidine-free medium.

40 [0081] A signal sequence compatible with the host is added as necessary to a base sequence for the N-terminal of the present receptor protein. A PhoA signal sequence, Omp A signal sequence etc. can be utilized for microorganisms of the genus Escherichia used as the host; an α -amylase signal sequence, subtilisin signal sequence etc. for microorganisms of the genus Bacillus as the host; an MF α signal sequence, SUC2 signal sequence etc. for yeasts as the host; and an insulin signal sequence, α -interferon signal sequence, antibody molecule signal sequence etc. for animal cells as the host.

45 [0082] The thus constructed vector containing the DNA encoding for the present receptor protein can be used to produce transformants.

[0083] The microorganisms of the genus Escherichia, the microorganisms of the genus Bacillus, yeasts, insect cells, insects, animal cells etc. are used as the host.

50 [0084] The microorganisms of the genus Escherichia used include, for example, Escherichia coli K12 DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1968)), JM103 (Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)), HB101 (Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)), C600 (Genetics, 39, 440 (1954)), etc.

[0085] The microorganisms of the genus Bacillus used include, for example, Bacillus subtilis MI114 (Gene, 24, 255 (1983)), 207-21 (Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)), etc.

55 [0086] The yeasts used include Saccharomyces cerevisiae AH22, AH22R⁺, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, Schizosaccharomyces pombe NCYC1913, NCYC2036, Pichia pastoris KM71, etc.

[0087] The insect cells used when the virus is AcNPV include, for example, cells (Spodoptera frugiperda cells; Sf cells) from an established cell line derived from caterpillars of Spodoptera frugiperda, MGI cells derived from the midgut

in *Trichoplusia ni*, High Five™ cells derived from eggs of *Trichoplusia ni*, cells derived from *Mamestra brassicae* and cells derived from *Estigmena acrea*. When the virus is BmNPV, cells (*Bombyx mori* N cells; BmN cells) from an established cell line derived from silkworms, etc., are used. The Sf cells used include, for example, Sf9 cells (ATCC CRL 1711), Sf21 cells (Vaughn, J. L. et al., *In Vivo*, 13, 213-217 (1977)), etc.

[0088] The insects used include, for example, silkworm caterpillars (Maeda et al., *Nature*, 315, 592 (1985)).

[0089] The animal cells used include, for example, simian cell COS-7, Vero, Chinese hamster ovary cells (abbreviated hereinafter to CHO cells), dhfr gene-defect Chinese hamster ovary cells (abbreviated hereinafter to CHO (dhfr) cells), mouse L cells, mouse AtT-20, mouse myeloma cells, rat GH3, human FL cells etc.

[0090] The microorganisms of the genus *Escherichia* can be transformed according to a method described in e.g. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972) or *Gene*, 17, 107 (1982). The microorganisms of the genus *Bacillus* can be transformed according to a method described in e.g. *Molecular & General Genetics*, 168, 111 (1979), etc.

[0091] The yeasts can be transformed according to a method described in e.g. *Methods in Enzymology*, 194, 182-187 (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929 (1978), etc.

[0092] The insect cells or insects can be transformed according to a method described in e.g. *Bio/Technology*, 6, 47-55 (1988), etc.

[0093] The animal cells can be transformed according to a method described in e.g. "Saibo Kogaku Bessatsu 8, Shin-Saibo Kogaku Jikken Protocol (Cell Technology, Extra Number 8, New Experimental Protocol in Cell Technology)", 263-267 (1995) (published by Shujunsha), *Virology*, 52, 456 (1973), etc.

[0094] Thereby, a transformant transformed with an expression vector comprising a DNA encoding a G protein coupled receptor protein can be obtained.

[0095] When transformants derived from the microorganisms of the genus *Escherichia* or *Bacillus* as the host are cultured, the medium used for their culture is preferably a liquid medium containing a carbon source, a nitrogen source, inorganic matter etc. necessary for growth of the transformants. The carbon source includes, for example, glucose, dextrin, soluble starch, sucrose etc.; the nitrogen source includes, for example, inorganic or organic materials such as ammonium salts, nitrates, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean cake and potato extract; and the inorganic matter includes, for example, calcium chloride, sodium dihydrogen phosphate, magnesium chloride etc. In addition, yeast, vitamins, growth promoters etc. may be added. The pH value of the medium is desirably about 5 to 8.

[0096] For example, the medium for culturing the microorganisms of the genus *Escherichia* is preferably M9 medium containing glucose and casamino acid (Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972). To permit the promoter to work efficiently, a chemical such as 3 β -indolylacrylic acid can be added as necessary.

[0097] The transformants from the microorganisms of the genus *Escherichia* as the host are cultured usually at about 15 to 43° C for about 3 to 24 hours during which the medium may be aerated or stirred as necessary.

[0098] The transformants from the microorganisms of the genus *Bacillus* as the host are cultured usually at about 30 to 40° C for about 6 to 24 hours during which the medium may be aerated or stirred as necessary.

[0099] The medium used for culturing the transformants from yeasts as the host includes, for example, Burkholder minimum medium (Bostian, K. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4505 (1980)) and SD medium containing 0.5% casamino acid (Bitter, G. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5330 (1984)). The pH value of the medium is adjusted preferably to about 5 to 8. The transformants are cultured usually at about 20 to 35° C for about 24 to 72 hours during which the medium may be aerated or stirred as necessary.

[0100] The medium used for culturing the transformants from insect cells or insects as the host includes, for example, a medium, if necessary prepared by adding inactivated additives such as 10% bovine serum to Grace's insect medium (Grace, T. C. C., *Nature*, 195, 788 (1962)). The pH value of the medium is adjusted preferably to about 6.2 to 6.4. The transformants are cultured usually at about 27° C for about 3 to 5 days during which the medium may be aerated or stirred as necessary.

[0101] The medium used for culturing the transformants from animal cells as the host includes, for example, MEM medium containing about 5 to 20% fetal bovine serum (*Science*, 122, 501 (1952)), DMEM medium (*Virology*, 8, 396 (1959)), RPMI 1640 medium (*The Journal of the American Medical Association*, 199, 519 (1967)), 199 medium (*Proceeding of the Society for the Biological Medicine*, 73, 1 (1950)) etc. The pH value is preferably about 6 to 8. The transformants are cultured usually at about 30 to 40 °C for about 15 to 60 hours during which the medium may be aerated or stirred as necessary.

[0102] As described above, the present G protein coupled receptor protein can be formed on cytoplasmic membranes of the transformants.

[0103] In order to separate the present receptor protein from the above culture and purify the protein, this can be performed, for example, by the following method.

[0104] To extract the present receptor protein from the cultured microorganisms or cells, the cultured microorganisms or cells are collected in a usual manner, suspended in a suitable buffer, disrupted by sonication, lysozyme and/or freezing and thawing, and centrifuged or filtered to give a crude extract of the receptor protein. The buffer may contain

receptor protein denaturants such as urea and guanidine hydrochloride and surfactants such as Triton X-100™. When the receptor protein is secreted into the culture liquid, the culture supernatant is collected by separating the supernatant from the cultured microorganisms or cells by a per se known method.

[0105] The culture supernatant thus obtained, or the receptor protein contained in the extract, can be purified by a suitable combination of separation and purification techniques known per se. These known separation and purification techniques make use of a method of utilizing solubility, such as salting-out and solvent precipitation, a method of mainly utilizing a difference in molecular weight, such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, a method of utilizing a difference in electric charge, such as ion-exchange chromatography, a method of utilizing specific affinity, such as affinity chromatography, a method of utilizing a difference in hydrophobicity, such as reverse-phase HPLC, a method of utilizing a difference in isoelectric point, such as isoelectric focusing.

[0106] If the receptor protein thus obtained is in a free form, it can be converted into a salt by a per se known method or its analogous method, while if the resulting receptor protein is obtained in the form of a salt, it can be converted into a free receptor protein or another salt by a per se known method or its analogous method.

[0107] Before or after purification, the receptor protein produced by the transformants can be arbitrarily modified or its partial polypeptide can be removed by allowing a suitable protein-modifying enzyme to act on the protein. For example, trypsin, chymotrypsin, arginyl endopeptidase, protein kinase or glycosidase is used as the protein-modifying enzyme.

[0108] The thus formed present receptor protein or a salt thereof can be measured by enzyme immunoassays or Western blotting with specific antibody.

[0109] The antibody against the present receptor protein and partial peptide or a salt thereof may be a polyclonal or monoclonal antibody capable of recognizing the present receptor protein or partial peptide or a salt thereof.

[0110] The antibody against the present receptor protein and partial peptide or a salt thereof (hereinafter abbreviated as present receptor protein and the like in some cases) can be produced by a known process for producing antibody or antiserum by using the present receptor protein as the antigen.

[Preparation of a monoclonal antibody]

(a) Preparation of monoclonal antibody-producing cells

[0111] The present receptor protein is administered alone or together with a carrier or a diluent into mammals at a site where the antibody can be produced by administration. To enhance the ability of the animals upon administration to produce the antibody, complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant may be administered. Administration is conducted usually once every 2 to 6 weeks and about 2 to 10 times in total. The mammals used include, for example, monkey, rabbit, dog, guinea pig, mouse, rat, sheep and goat. Among others, mouse and rat are preferably used.

[0112] For production of the monoclonal antibody-producing cells, those animals having antibody titer are selected from the warm-blooded animals (e.g. mice) immunized with the antigen, and on the second to fifth day after the final immunization, their spleens or lymph nodes are collected, and the antibody-producing cells contained therein are fused with myeloma cells from animals of the same or different species, whereby monoclonal antibody-producing hybridoma can be produced. The antibody titer in antiserum can be measured for example by reacting the antiserum with the labeled protein described below and then measuring the activity of the labeling agent bound to the antibody. Fusion can be carried out by a known method such as the method of Keller and Millstein (Nature, 256, 495 (1975)). The fusion promoter includes polyethylene glycol (PEG) and Sendai virus, and PEG is preferably used.

[0113] The myeloma cells include myeloma cells from warm-blooded animals, such as NS-1, P3U1 and SP2/0 among which P3U1 is preferably used. The ratio of the antibody-producing cells (spleen cells) to the myeloma cells used is from 1 : 1 to 20 : 1, and cell fusion can be effected efficiently by incubating the cells for about 1 to 10 minutes at 20 to 40 °C, preferably 30 to 37 °C, in the presence of PEG (preferably PEG 1000 to PEG 6000) at a concentration of about 10 to 80%.

[0114] The monoclonal antibody-producing hybridoma can be screened by various methods, for example by adding a culture supernatant of the hybridoma to a solid phase (e.g., a microplate) having the antibody of the receptor protein, etc adsorbed thereon directly or along with a carrier and then adding a radioactive substance or enzyme-labeled anti-immunoglobulin antibody (which is e.g. an anti-mouse immunoglobulin antibody when mouse cells are subjected to cell fusion) or protein A to detect the monoclonal antibody bound to the solid phase or by adding a culture supernatant of the hybridoma to a solid phase having an anti-immunoglobulin antibody or protein A adsorbed thereon and then adding the receptor protein labeled with a radioactive substance or an enzyme to detect the monoclonal antibody bound to the solid phase.

[0115] The monoclonal antibody can be screened according to a per se known method or its analogous manner. Screening can be carried out usually in an animal cell culture medium to which HAT (hypoxanthine, aminopterin, thy-

midine) was added. The screening and breeding medium may be any medium in which the hybridoma can grow. Examples of such medium include PRMI 1640 medium containing 1 to 20% (preferably 10 to 20%) FBS, GIT medium containing 1 to 10% FBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), and a serum-free medium for hybridoma culture (SFM-101, Nissui Pharmaceutical, Co., Ltd.). The culture temperature is usually 20 to 40 °C, preferably about 37 °C. The culture time is usually 5 days to 3 weeks, preferably 1 to 2 weeks. Culture can be conducted usually in 5% CO₂ gas. The antibody titer in a culture supernatant of the hybridoma can be measured in the same manner as in the measurement of the antibody titer in antiserum as described above.

(b) Purification of the monoclonal antibody

[0116] Separation and purification of a monoclonal antibody can be performed according to the per se known method, for example, a method of separating and purifying an immunoglobulin [such as a salting-out method, an alcohol precipitation method, an isoelectric precipitation method, an electrophoresis method, an adsorbing-desorbing method with an ion-exchanger (such as DEAE), an ultracentrifugation method, a gel filtration method, a specific purifying method of obtaining an antibody by taking only an antibody with an antigen binding solid phase or an active absorbing agent such as protein A or protein G, and dissociating a binding, as in the normal separation and purification of a polyclonal antibody.

[Preparation of a polyclonal antibody]

[0117] A polyclonal antibody of the present invention can be prepared by the per se known method or its analogous method. For example, the polyclonal antibody can be prepared by making a complex of an immune antigen (antigen such as receptor protein and the like), immunizing a mammal as in the method for preparing the above monoclonal antibody, taking a material comprising an antibody to the present receptor protein from the immunized animal, and separating and purifying the antibody.

[0118] For the conjugate of the immune antigen with a carrier protein used for immunizing mammals, the type of the carrier protein and the mixing ratio of the carrier to the hapten are not particularly limited insofar as the desired antibody can be efficiently produced by immunization with the antigen crosslinked via the hapten with the carrier, and for example, the conjugate is produced by coupling the hapten with bovine serum albumin, bovine cytoglobulin, hemocyanin or the like in a ratio of 1 to about 0.1 to 20, preferably about 1 to 5.

[0119] The hapten can be coupled with the carrier by use of various condensing agents such as glutaraldehyde, carbodiimide, maleimide-activated ester, and activated ester reagents containing thiol group and dithiopyridyl group.

[0120] The resulting condensation product is administered alone or together with a carrier or a diluent into warm-blooded animals at a site where the antibody can be produced. To enhance the ability of the animals upon administration to produce the antibody, complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant may be administered. Administration is conducted usually once every 2 to 6 weeks and about 3 to 10 times in total.

[0121] The polyclonal antibody can be collected from blood, ascites etc. preferably blood in the mammals immunized by the method described above.

[0122] The polyclonal antibody titer in antiserum can be measured in the same manner as in the measurement of the antibody titer in antiserum as described above. Separation and purification of the polyclonal antibody can be carried out by a method of separating and purifying immunoglobulin, which is similar to the separation and purification of the monoclonal antibody as described above.

[0123] The present receptor protein or a salt thereof, a partial peptide thereof or a salt thereof, and a DNA encoding the receptor protein or a partial peptide thereof can be used for (1) determination of a ligand (agonist) for the present G protein coupled receptor protein, (2) an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient function of the present G protein coupled receptor protein, (3) gene diagnostic agent, (4) a method for screening a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof, (5) an agent for preventing and/or treating various diseases comprising a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof, (6) a method for quantitating a ligand for the present G protein coupled receptor protein, (7) a method for screening a compound which alters binding of the present G protein coupled receptor protein with a ligand (agonist and antagonist), (8) an agent for preventing and/or treating various diseases comprising a compound which alters binding of the present G protein coupled receptor protein with a ligand (agonist and antagonist), (9) quantitation of the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, (10) a method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane, (11) an agent for preventing and/or treating various diseases comprising a compound which alters an amount of the present receptor protein or its partial peptide in a cell membrane, (12) neutralization by an antibody to the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof and (13) preparation of a non-human animal having a DNA encoding the present G protein coupled receptor protein.

[0124] In particular, by using a receptor binding assay system using an expression system of the present recombinant G protein coupled receptor protein, a compound which alters binding of a ligand with a G protein coupled receptor specific for a human being and a mammal (for example, agonist and antagonist) can be screened, the agonist or the antagonist can be used as an agent for preventing or treating various diseases.

[0125] The uses of the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof (hereinafter abbreviated as present receptor protein and the like in some cases), a DNA encoding the present receptor protein or a partial peptide thereof (hereinafter abbreviated as present DNA in some cases) and an antibody to the present receptor protein and the like (hereinafter abbreviated as present antibody) will be explained specifically below.

(1) Determination of a ligand (agonist) for the present G protein coupled receptor protein

[0126] The present receptor protein or a salt thereof or the present partial peptide or a salt thereof is useful as a reagent for searching or determining a ligand (agonist) for the present receptor protein or a salt thereof.

[0127] That is, the present invention provides a method for determining a ligand for the present receptor protein, which comprises contacting the present receptor protein or a salt thereof or a present partial peptide or a salt thereof, with a test compound.

[0128] As the test compound, the known ligands (for example, angiotensin, bombesin, cannabinoids, cholecystokinin, glutamine, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene related peptide), leukotriene, pancreastatin, prostaglandin, thromboxane, adenosine, adrenaline, α and β -chemokine (for example, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 α , MIP-1 β , RANTES), endothelin, enterogasttrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin), as well as a tissue extract and a cell culture supernatant of a human being or a mammal (for example, mouse, rat, pig, cow, sheep and monkey) are used. For example, a single ligand can be finally obtained by adding the tissue extract or the cell culture supernatant to the present receptor protein, and fractionating while measuring the cell stimulating activity.

[0129] More particularly, a method for determining the present ligand is a method for determining a compound (for example, peptide, protein, non-peptide compound, synthetic compound and fermentation product) or a salt thereof having the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca²⁺ release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) by binding with the present receptor protein, by using the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, or by using constructing an expression system for a recombinant receptor protein, and using a receptor finding assay system employing the expression system.

[0130] The method for determining a ligand of the present invention is characterized in that an amount of a test compound bound to the present receptor protein or a partial peptide and the cell stimulating activity when the receptor protein or the partial peptide thereof are contacted with a test compound are measured.

[0131] More particularly, the present invention provides:

(a) a method for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, which comprises measuring an amount of a labeled test compound bound to the present receptor protein or a salt thereof, or the present partial peptide or a salt in the case where a labeled test compound is contacted with the protein or a salt thereof or the partial peptide or a salt thereof,

(b) a method for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, which comprises measuring an amount of a labeled test compound bound to a cell comprising the present receptor protein or a membrane fraction of the cell in the case where a labeled test compound is contacted with the cell or the membrane fraction,

(c) a method for determining a ligand for the present receptor protein, which comprises measuring an amount of a labeled test compound bound to a receptor protein or a salt thereof in the case where a labeled test compound is contacted with the receptor protein expressed on a cell membrane by culturing a transformant comprising a DNA encoding the present receptor protein,

(d) a method for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, which comprises measuring the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca²⁺ release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a receptor protein in the case where a test compound is contacted with a cell comprising the present receptor protein, and

(e) a method for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, which comprises measuring the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine

release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a receptor protein in the case where a test compound is contacted with a receptor protein expressed on a cell membrane by culturing a transformant comprising a DNA encoding the present receptor protein.

[0132] In particular, it is preferable that the above experiments (d) to (e) are carried out after the above experiments (a) to (c) are carried out and binding of a test compound to the present receptor protein is confirmed.

[0133] First, as a receptor protein used for a ligand determining method, any receptor proteins may be used as long as they contain the aforementioned present receptor protein or present partial peptide and a receptor protein which was expressed at a large amount using an animal cell is suitable.

[0134] In order to prepare the present receptor protein, the aforementioned expression method is used but it is preferable that preparation is performed by expressing a DNA coding the receptor protein in a mammal cell or an insect cell. As a DNA fragment encoding a protein part of interest, a complementary DNA is usually used but is not necessarily limited to it. For example, a gene fragment or a synthetic DNA may be used. In order to introduce a DNA fragment encoding the present receptor protein into a host animal cell and express it effectively, it is preferable that the DNA fragment is incorporated into downstream of polyhedron. promoter of nuclear polyhedrosis virus (NPV) belonging to Baculovirus for which a host is an insect, SV40 derived promoter, promoter of retrovirus, metallothionein promoter, human heat shock promoter, cytomegalovirus promoter and $\text{SR}\alpha$ promoter. Investigation of an amount and quality of the expressed receptor can be conducted by the per se known method. The investigation can be conducted by, for example, a method described in a reference [Nambi, P. et al., J. Biol. Chem., vol. 267, pp. 19555-19559, 1992].

[0135] Therefore, in the present ligand determining method, a material comprising the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof may be a receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof purified according to the per se known method, or a cell comprising the receptor protein or a cell membrane fraction thereof may be used.

[0136] In the present ligand determining method, when a cell comprising the present receptor protein is used, the cell may be fixed with glutaraldehyde or formalin. The fixing method can be conducted according to the per se known method.

[0137] A cell comprising the present receptor protein refers to a host cell which expressed the present receptor protein and, as the host cell, Escherichia coli, Bacillus subtilis, yeast, insect cell and animal cell are used.

[0138] A cell membrane fraction refers to a fraction in which a cell membrane obtained by the per se known method after rupture of a cell is contained at a large amount. As a method for breaking a cell, there are a method of squeezing a cell with a Potter-Elvehjem type homogenizer, breakage with a Waring Blender or Polytron (manufactured by Kinematica), breakage by ultrasound, and breakage by jetting a cell through a thin nozzle while pressuring with a French press. For fractionating a cell membrane, a fractionating method by centrifugation force such as a fractionating centrifugation method and density gradient centrifugation method is mainly used. For example, a broken cell solution is centrifuged at a low speed (500 rpm-3000 rpm) for shorter period of time (usually, about 1 minute to 10 minutes), the supernatant is centrifuged at a higher speed (15000 rpm-30000 rpm) usually for 30 minutes to 2 hours, and the resulting precipitate is used as a membrane fraction. An expressed receptor protein and membrane components such as cell-derived phospholipid and membrane protein are contained at a large amount in the membrane fraction. An amount of a receptor protein in a cell comprising the receptor protein or its membrane fraction is preferably 10^3 - 10^8 molecules, suitably 10^5 - 10^7 molecules per cell. In addition, as an expressed amount is larger, ligand binding activity per a membrane fraction (specific activity), not only high sensitive screening system can be constructed but also a large amount of samples can be measured at the same lot.

[0139] In order to conduct the above methods (a) to (c) for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, a suitable receptor protein fraction and a labeled test compound are necessary.

[0140] As a receptor protein fraction, a natural receptor protein fraction or a recombinant receptor fraction having the equal activity thereto are desirable. Here, equal activity denotes equal ligand binding activity and signal information transmission action.

[0141] As a labeled test compound, angiotensin, bombesin, canabinoide, cholecystokinin, glutamine, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene related peptide), leukotriene, pancroastatin, prostaglandin, thromboxane, adenosine, adrenaline, α and β -chemokine (for example, IL-8, $\text{GRO}\alpha$, $\text{GRO}\beta$, $\text{GRO}\gamma$, NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 α , MIP1 β , RANTES), endothelin, nterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide and galanin which are labeled with [^3H], [^{125}I], [^{14}C] or [^{35}S] are suitable.

[0142] More particularly, in order to conduct a method for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, first, an authentic receptor is prepared by suspending a cell comprising the present receptor protein or a membrane fraction of the cell in a buffer suitable for the determination method. Any buffers which do not inhibit binding

of a ligand with a receptor protein may be used such as phosphate buffer and Tris-hydrochloric acid buffer of pH 4-10 (desirably pH 6-8). In addition, in order to decrease non-specific binding, surfactants such as CHAPS, Tween-80™ (Kao-Atlas Company), digitonin, and deoxycholate and various proteins such as bovine serum albumin and gelatin may be added to a buffer. Further, in order to suppress degradation of a receptor and a ligand by a protease, a protease inhibiting agent such as PMSF, leupeptin, E-64 (manufactured by Peptide Laboratory) and pepstatin may be added. A test compound labeled with a constant amount (5000 cpm-500000 cpm) of [³H], [¹²⁵I], [¹⁴C] and [³⁵S] is present in 0.01 ml to 10 ml of the receptor solution. In order to know an amount of non-specific binding (NSB), a reaction tube to which a largely excessive amount of an unlabeled test compound has been added is also prepared. The reaction is conducted at about 0 °C to 50 °C, preferably about 4 °C to 37 °C, for about 20 minutes to 24 hours, desirably about 30 minutes to 3 hours. After the reaction, the reaction is filtered with a glass fiber filtering paper, washed with a suitable amount of the same buffer, and the radioactivity remaining in a glass fiber filtering paper is measured by a scintillation counter or a γ -counter. A test compound having greater than zero cpm of a count (B-NSB) obtained by a total binding amount (B) minus a non-specific binding amount (NSB) can be selected as a ligand (agonist) for the present receptor protein or a salt thereof.

[0143] In order to conduct the above methods (d) - (e) for determining a ligand for the present receptor protein or a salt thereof, the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca²⁺ release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via the receptor protein can be measured by the known method or using a commercially available measuring kit. More particularly, first, a cell comprising a receptor protein is cultured on a multiwellplate. Upon implementation of ligand determination, a medium and a buffer are exchanged with a fresh medium or a suitable buffer showing no toxicity to a cell in advance, a test compound is added to incubate for a constant period of time, a cell is extracted or the supernatant is recovered, and the produced product is quantitated according to respective methods. When the production of a substance as an index for the cell stimulating activity (for example, arachidonic acid) is difficult to be assayed due to a degrading enzyme contained in a cell, an assay may be conducted by adding an inhibitor for the degrading enzyme. In addition, regarding the activity such as cAMP production inhibition, it can be detected as production inhibiting action to a cell for which a fundamental producing amount of a cell has been increased by forskolin.

[0144] A kit for determining a ligand which binds to the present receptor protein or a salt thereof comprises the present receptor protein or a salt thereof, the present partial peptide or a salt thereof, a cell comprising the present receptor protein, or a membrane fraction of a cell comprising the present receptor protein.

[0145] Examples of the present ligand determining kit are as follows.

1. Ligand determining reagent

(a) A measuring buffer and a washing buffer

Hanks' Balanced Salt Solution (manufactured by Gibco) with 0.05% bovine serum albumin (manufactured by Sigma) added

Buffers may be sterile-filtered with a filter having a pore diameter of 0.45 μ m and stored at 4 °C, or may be prepared upon use.

(b) Authentic G protein coupled receptor protein

CHO cells which expressed the present receptor protein are passaged into a 12-well plate at 5×10^5 well, and cultured at 37°C and 5% CO₂ and 95% air for 2 days.

(c) Labeled test compound

A compound labeled with commercially available [³H], [¹²⁵I], [¹⁴C] or [³⁵S], or labeled with a suitable method

An aqueous solution is stored at 4 °C or -20 °C, and diluted with a measuring buffer to 1 μ M upon use. A test compound showing poor solubility in water is dissolved in dimethylformamide, DMSO or methanol.

(d) Unlabeled test compound

The same compound as labeled compound is prepared at the 100- to 1000-fold concentration.

2. Measuring method

(a) CHO cells expressing the present receptor protein cultured by a 12-well tissue culturing plate are washed twice with 1 ml of a measuring buffer, and 490 μ l measuring buffer is added to each well.

(b) 5 μ l of a labeled test compound is added to react at room temperature for 1 hour. In order to know an amount of non-specific binding, 5 μ l of a non-labeled test compound is added.

(c) A reaction solution is removed and washed three times with 1 ml of a washing buffer. A labeled test compound bound to a cell is dissolved in 0.2 N NaOH-1% SDS, and mixed with 4 ml of a liquid scintillator A

(manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

(d) The radioactivity is measured using a liquid scintillation counter (manufactured by Beckmann).

[0146] As a ligand which can bind to the present receptor or a salt thereof, for example, there are substances present in brain, pituitary gland and pancreas, and more particularly, angiotensin, bombesin, cannabinoids, cholecystokinin, glutamine, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene related peptide), leukotriene, pancreastatin, prostaglandin, thromboxane, adenosine, adrenaline, α and β -chemokine (for example, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 α , MIP-1 β , RANTES), endothelin, enterogasttrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide and galanin are used.

(2) An agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient of the present G protein coupled receptor protein

[0147] In the above (1) method, when a ligand for the present receptor protein is revealed, (a) the present receptor protein or (b) a DNA encoding the receptor protein can be used as a medicine for preventing and/or treating diseases associated with the deficient function of the present receptor protein depending upon the action harbored by the ligand.

[0148] For example, when there is a patient for whom the ligand physiological action can not be expected (lack of the receptor protein) due to a decrease in the present receptor protein in the living body, an amount of a receptor protein in the living body of the patient can be increased and the action of a ligand can be sufficiently exerted by (i) compensating for an amount of the receptor protein by administering the present receptor protein to the patient or by (ii) (a) administering a DNA encoding the present receptor protein to the patient to express the DNA, or (b) inserting a DNA encoding the present receptor protein into a subject cell to express the DNA, and transplanting the cell into the patient. That is, a DNA encoding the present receptor protein is useful as a safe and low toxic agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient function of the present receptor protein.

[0149] The present receptor protein is recognized to have about 30% homology with MAS which is one kind of G protein coupled receptor proteins, at an amino acid sequence level. Since there is a report that a change in the central function such as exasperation of anxiety was recognized in a MAS gene-deficient mouse [J. B. C., 273 (No. 19), 11867-11873 (1998)], a MAS gene is thought to have some roles in expression of the central function. Therefore, the present receptor protein which is recognized to have homology with MAS is useful for preventing and/or treating diseases associated with dysfunction of the central function (for example, mental diseases comprising anxiety, schizophrenia, manic-depressive psychosis, dementia, mental retardation and dyskinesia). Since there is a report that high expression of a rat MAS gene is shown in a variety of peripheral organs immediately after birth and, after mature, high expression is shown in testis other than the central [FEBS Lett. 357:27-32 (1995)], the gene is thought to have an important role on acquisition of growth and function of cells and reproduction. Therefore, the present receptor protein which is recognized to have homology with MAS is useful for preventing and/or treating respiratory diseases, circulatory diseases, digestive tract, liver/ gallbladder/ pancreas diseases, and endocrine diseases.

[0150] When the present receptor protein is used as the above preventing or treating agent, it can be formulated according to the conventional means.

[0151] On the other hand, when a DNA encoding the present receptor protein (hereinafter abbreviated as present DNA in some cases) is used as the above preventing or treating agent, the present DNA can be implemented according to the conventional means, alone or after inserted into a suitable vector such as a retrovirus vector, an adenovirus vector, and an adenovirus vector-associated virus vector. The present DNA can be administered alone or together with an auxiliary agent for promoting uptake by a catheter such as a gene gun or a hydrogel.

[0152] For example, (a) the present receptor protein or (b) a DNA encoding the receptor protein can be used orally as tablets which is coated with a sugar-coating if necessary, capsules, elixirs, or microcapsules, or can be used parenterally in the form of an injection such as a sterile solution or a suspension with water or other pharmaceutically acceptable solution. For example, (a) the present receptor protein or (b) a DNA encoding the receptor protein can be prepared by blending with a physiologically acceptable carriers, flavors, excipients, vehicles, preservatives, stabilizers and binders into a unit dosage form required for the generally recognized preparation implementation. An amount of an effective ingredient in these preparations is such that a suitable volume in an indicated range can be obtained.

[0153] The additives which can be admixed with the tablets, capsules etc. include, for example, binders such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swelling agents such as corn starch, gelatin and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweeteners such as sucrose, lactose and saccharine, and flavors such as peppermint, akamono oil and cherry. When one capsule is in a unit form, liquid carriers such as fats and oils can be contained in the materials described above. The aseptic composition for injection can be formulated according to conventional pharmaceutical manufacturing by dissolving or suspending the active material

and naturally occurring vegetable oils such as sesame oil and coconut oil in vehicles such as injection water. The aqueous solution for injection includes, for example, physiological saline or an isotonic solution containing glucose and other supplementary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride etc.), and may be used in combination with suitable solubilizer such as alcohols (e.g., ethanol etc.), polyalcohols (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol etc.) and nonionic surfactants (e.g., Polysorbate 80™, HCO-50 etc.). The oily solution includes, for example, sesame oil, soybean oil etc., and may be used in combination with solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol etc. In addition, the above preventing or treating agent may be blended, for example, with the buffer (e.g., phosphate buffer, sodium acetate buffer etc.), soothing agents (e.g., benzalkonium chloride, procaine hydrochloride etc.), stabilizers (e.g., human serum albumin, polyethylene glycol etc.), preservatives (e.g., benzyl alcohol, phenol etc.), antioxidants etc. Usually, the prepared injection is introduced into suitable ampoules.

[0154] Since the thus obtained preparation is safe and low toxic, it can be administered, for example, to a human being or a mammal (such as rat, rabbit, sheep, cow, cat, dog, and monkey).

[0155] A dose of the present receptor protein is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and a route of administration. When orally administered, the dose is generally about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg per day in an adult (60 kg). When parenterally administered, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, for example, in the form of an injection, it is around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg per day by intravenous injection in an adult (60 kg). In the case of other animal, an amount calculated per 60 kg can be administered.

[0156] A dose of the present DNA is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, for example, in the case of oral administration, it is generally about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg per day in an adult (60 kg). When parenterally administered, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, for example, in the form of an injection, it is advantageous to administer around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg per day in an adult. In the case of other animals, an amount calculated per 60 kg can be administered.

(3) Gene diagnostic agent

[0157] Since the present DNA can detect abnormality of a DNA or a mRNA encoding the present receptor or a partial peptide thereof (gene abnormality) in a human being or a mammal (such as rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey) by using as a probe, it is useful as a gene diagnostic agent for damage, mutation or expression reduction of the DNA or mRNA, or increase or excess expression of the DNA or mRNA.

[0158] The above gene diagnosis using the present DNA can be conducted, for example, by the per se known method of Northern hybridization or PCR-SSCP (Genomics, vol. 5, pp.874-879 (1989), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.86, pp. 2766-2770 (1989)).

(4) A method for screening a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof

[0159] The present DNA can be used for screening a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof by using as a probe.

[0160] That is, the present invention provides a method for screening a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof, by measuring an amount of a mRNA of the present receptor or a partial peptide thereof contained in (i) non-human mammal-derived (a) blood, (b) particular organ, and (c) tissue or cell isolated from an organ, or (ii) transformant.

[0161] Measurement of an amount of a mRNA of the present receptor protein or a partial peptide thereof is specifically conducted as follows.

- (i) A drug (for example, anti-dementia drug, blood pressure decreasing agent, anti-cancer agent and anti-obesity drug) or a physical stress (for example, inundation stress, electric stress, light and dark, low temperature) is given to a normal or disease model non-human mammal (for example, mouse, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey, more particularly, dementia rat, obesity mouse, arterial sclerosis rabbit and cancer carrying mouse) and, after a predetermined period of time, blood or particular organs (for example, brain, liver and kidney), or a tissue or a cell isolated from organs is obtained.

A mRNA of the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in the resulting cell can be quantitated, for example, by extracting a mRNA from a cell and the like by a normal method and, for example, using a method such as TaqManPCR and can be also analyzed by conducting Northern blot by the per se known

means.

(ii) A transformant expressing the present receptor protein or a partial peptide is prepared according to the aforementioned method, a mRNA of the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in the transformant can be quantitated and analyzed similarly.

[0162] Screening of a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof can be conducted by

(i) administering a test compound to a normal or a disease model non-human mammal, a constant period of time before (30 minutes to 24 hours before, preferably 30 minutes to 12 hours before, more preferably 1 hour to 6 hours before), or a constant period of time after (30 minutes to 3 days after, preferably 1 hour to 2 days after, more preferably 1 hour to 24 hours after) giving a drug or a physical stress, or at the same time with a drug or a physical stress, and quantitating and analyzing an amount of a mRNA of the present receptor protein or a partial peptide contained in a cell after a constant period of time (30 minutes to 3 days, preferably 1 hour to 2 days, more preferably 1 hour to 24 hours) has passed, and by

(ii) mixing a test compound into a medium upon culturing of a transformant according to the conventional method, and quantitating and analyzing an amount of a mRNA of the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in the transformant after a constant period of time of culturing (after 1 day to 7 days, preferably after 1 day to 3 days, more preferably after 2 days to 3 days).

[0163] A compound or a salt thereof obtained by using the present screening method is a compound having the activity which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof, more particularly, (a) a compound which enhances the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a G protein coupled receptor by increasing an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof, (b) a compound which reduces the cell stimulating activity by decreasing an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof.

[0164] Examples of the compound include a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound and a fermentation product. These compounds may be a novel compound or the known compound.

[0165] A compound which enhances the cell stimulating activity is useful as a safe and low toxic medicine for enhancing the physiological activity of the present receptor protein and the like.

[0166] A compound which reduces the cell stimulating activity is useful as a safe and low toxic medicine for decreasing the physiological activity of the present receptor protein and the like.

[0167] When a compound or a salt thereof obtained by using the present screening method is used as a pharmaceutical composition, the use can be implemented according to the conventional means. For example, the compound may be formulated into tablets, capsules, elixirs, microcapsules, sterile solution and suspension as in the aforementioned medicine comprising the present receptor protein.

[0168] Since the thus obtained preparations are safe and low toxic, they can be administered, for example, to a human being or a mammal (for example, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey).

[0169] A dose of the compound or a salt thereof is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, when orally administered, the dose is generally about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg per day in an adult (60 kg). When parenterally administered, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom, and an administration method and it is usually advantageous to administer at an amount of around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg per day by intravenous injection in the form of an injection in an adult (60 kg). In the case of other animals, an amount calculated per 60 kg can be administered.

(5) An agent for preventing and/or treating various diseases comprising a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof

[0170] It is considered that the present receptor protein plays some important role in the living body such as central functions as described above. Therefore, a compound which alters an amount of expression of the present receptor protein or a partial peptide thereof can be used as an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient functions of the present receptor protein.

[0171] When the compound is used as an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient functions of the present receptor protein, it can be formulated according to the conventional means.

[0172] For example, the compound can be used orally as tablets coated with a sugar-coating if necessary, capsules,

elixirs and microcapsules, or parenterally in the form of an injection such as a sterile solution with water or other pharmaceutically acceptable solution, or suspension. For example, the preparations may be produced by mixing the compound with the physiologically recognized known carriers, flavors, excipients, vehicles, antiseptics, stabilizers and binders in an unit dosage form required for generally recognized preparation implement. An amount of an active ingredient in these preparations is such that a suitable volume in an indicated range is obtained.

[0173] The additives which can be admixed with the tablets, capsules etc. include, for example, binders such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swelling agents such as corn starch, gelatin and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweeteners such as sucrose, lactose and saccharine, and flavors such as peppermint, akamono oil and cherry. When one capsule is in a unit form, liquid carriers such as fats and oils can be contained in the materials described above. The aseptic composition for injection can be formulated according to conventional pharmaceutical manufacturing by dissolving or suspending the active material and naturally occurring vegetable oils such as sesame oil and coconut oil in vehicles such as injection water. The aqueous solution for injection includes, for example, physiological saline or an isotonic solution containing glucose and other supplementary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride etc.), and may be used in combination with suitable solubilizer such as alcohols (e.g., ethanol etc.), polyalcohols (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol etc.) and nonionic surfactants (e.g., Polysorbate 80™, HCO-50 etc.). The oily solution includes, for example, sesame oil, soybean oil etc., and may be used in combination with solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol etc. In addition, the above preventing or treating agent may be blended, for example, with the buffer (e.g., phosphate buffer, sodium acetate buffer etc.), soothing agents (e.g., benzalkonium chloride, procaine hydrochloride etc.), stabilizers (e.g., human serum albumin, polyethylene glycol etc.), preservatives (e.g., benzyl alcohol, phenol etc.), antioxidants etc. Usually, the prepared injection is introduced into suitable ampoules.

[0174] Since the thus obtained preparation is safe and low toxic, it can be administered, for example, to a human being or a mammal (such as rat, rabbit, sheep, cow, cat, dog, and monkey).

[0175] A dose of the compound or a salt thereof is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, when orally administered, the dose is generally about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferable about 1.0 to 20 mg per day in an adult (60 kg). When parenterally administered, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and it is usually advantageous to administer by intravenous injection at an amount of around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg per day in the form of an injection in an adult (60 kg). In the case of other animals, an amount calculated per 60 kg can be administered.

(6) A method for quantitating a ligand for the present G protein coupled receptor protein

[0176] Since the present receptor protein and the like have the property of binding to a ligand, the ligand concentration in the living body can be quantitated with a better sensitivity.

[0177] The present quantitation method can be used by combining, for example, with a competition method. That is, the ligand concentration in a test compound can be measured by contacting a test compound with the present receptor protein and the like. More particularly, for example, the method can be used according to a method described in the following (a) or (b) or its analogous method.

(a) "Radioimmunoassay" ed. by Hiroshi Irie (Kodansha, published in 1974)

(b) "Radioimmunoassay", "second series" ed. by Hiroshi Irie (Kodansha, published in 1979)

(g) A method for screening a compound (such as agonist and antagonist) which alters binding of the present G protein coupled receptor protein with a ligand

[0178] A compound (for example, peptide, protein, non-peptide compound, synthetic compound, and fermentation product) or a salt thereof can be effectively screened by using the present receptor protein and the like, or constructing an expression system for a recombinant receptor protein and using a receptor binding assay system using the expression system.

[0179] Such the compound includes (a) a compound having the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a G protein coupled receptor (so called agonist for the present receptor protein), (b) a compound having no cell stimulating activity (so called antagonist for the present receptor protein), (c) a compound which enhances binding of a ligand with the present G protein coupled receptor protein, or (d) a compound which reduces binding of a ligand with the present G protein coupled receptor protein (for the above (a) compound, it is preferable to screen by the aforementioned ligand determining method).

[0180] That is, the present invention provides a method for screening a compound or a salt thereof which alters

binding of a ligand with the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, which comprises comparing (i) the case where the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof is contacted with a ligand, with (ii) the case where the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof is contacted with a ligand and a test compound.

[0181] The present screening method is characterized in that, for example, an amount of a ligand bound to the receptor protein and the like, and the cell stimulating activity in the case of (i) and (ii) are measured and compared.

[0182] More particularly, the present invention provides:

(a) a method for screening a compound or a salt thereof which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, which comprises measuring and comparing an amount of a labeled ligand bound to the receptor protein and the like in the case where a labeled ligand is contacted with the present receptor protein and the like and the case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the present receptor protein and the like,

(b) a method for screening a compound or a salt thereof which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, which comprises measuring and comparing an amount of a labeled ligand bound to a cell comprising the present receptor protein and the like or a membrane fraction of the cell in the case where a labeled ligand is contacted with the cell or the membrane fraction and the case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the cell or the membrane fraction,

(c) a method for screening a compound or a salt thereof which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, which comprises measuring and comparing an amount of a labeled ligand bound to a receptor protein and the like expressed on a cell membrane by culturing a transformant comprising the present DNA in the case where a labeled ligand is contacted with the receptor protein and the like and the case where a labeled ligand and a test compound are contacted with the receptor protein and the like,

(d) a method for screening a compound or a salt thereof which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, which comprises measuring and comparing the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a receptor in the case where a compound which activates the present receptor protein and the like (for example, a ligand for the present receptor protein and the like) is contacted with a cell comprising the present receptor protein and the like and the case where a compound which activates the present receptor protein and the like and a test compound are contacted with a cell comprising the present receptor protein and the like, and

(e) a method for screening a compound or a salt thereof which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, which comprises measuring and comparing the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a receptor in the case where a compound which activates the present receptor protein and the like (for example, a ligand for the present receptor protein and the like) is contacted with the present receptor protein and the like expressed on a cell membrane by culturing a transformant comprising the present DNA and the case where a compound which activates the present receptor protein and the like and a test compound are contacted with the present receptor protein and the like expressed on a cell membrane by culturing a transformant comprising the present DNA.

[0183] Before the present receptor protein and the like are obtained, when a G protein coupled receptor agonist or antagonist is screened, it was necessary to obtain first a candidate compound using a cell, a tissue or its cell membrane fraction comprising a G protein coupled receptor protein of a rat (primary screening) and, thereafter, to confirm whether the candidate compound actually inhibits binding of a human G protein coupled receptor protein with a ligand (secondary screening). When a cell, a tissue or a cell membrane fraction is used as it is, since other receptor proteins are present in admixture therewith, it was difficult to actually screen an agonist or an antagonist for a receptor protein of interest.

[0184] However, for example, the use of the present human-derived receptor protein eliminates the necessity of the primary screening and can effectively screen a compound which inhibits binding of a ligand with a G protein coupled receptor. Further, whether the screened compound is an agonist or an antagonist can be simply assessed.

[0185] The present screening method will be specifically explained in detail.

[0186] First, although as the present receptor protein and the like used for the present screening method, any receptor proteins comprising the aforementioned present receptor protein and the like may be used, a cell membrane fraction of an organ of a mammal comprising the present receptor protein and the like is suitable. However, since it is extremely difficult to obtain, in particular, a human-derived organ, a human-derived receptor protein and the like expressed at a

large amount using a transformant are suitable for use in screening.

[0187] For preparing the present receptor protein and the like, the aforementioned method is used but it is preferable to prepare by expression of the present DNA in a mammal cell or an insect cell. As a DNA fragment encoding a protein part of interest, a complementary DNA is used but is not necessarily limited to it. For example, a gene fragment for a synthetic DNA may be used. In order to introduce a DNA fragment encoding the present receptor protein into a host animal cell and express it effectively, it is preferable to incorporate the DNA fragment downstream of a polyhedrin promoter of nuclear polyhedrosis virus (NPV) belonging to Baculovirus for which a host is an insect, a SV40 derived promoter, a retrovirus promoter, a metallothionein promoter, a human heat shock promoter, a cytomegalovirus promoter and a SR α promoter. Investigation of amount and quality of the expressed receptor can be carried out by the per se known method. It can be carried out, for example, by a method described in the reference [Nambi, P. et al., J. Biol. Chem., vol. 267, pp. 19555-19559, 1992].

[0188] Therefore, in the present screening method, a material comprising the present receptor protein and the like may be a receptor protein and the like purified according to the per se known method, a cell comprising the receptor protein and the like may be used, or a membrane fraction of a cell comprising the present protein and the like may be used.

[0189] In the present screening method, when a cell comprising the present receptor protein and the like is used, the cell may be fixed with glutaraldehyde or formalin. A fixing can be conducted according to the per se known method.

[0190] A cell comprising the present receptor protein and the like refers to a host cell which has expressed the receptor protein and the like and, as the host cell, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, yeast, insect cell and animal cell are preferable.

[0191] A cell membrane fraction refers to a fraction comprising a large amount of a cell membrane obtained by the per se known method after rupture of a cell. As a method for breaking a cell, there are a method of squeezing a cell with a Potter-Elvehjem type homogenizer, breakage with a Waring Blender or Polytron (manufactured by Kinematica), breakage by ultrasound, and breakage by jetting a cell through a thin nozzle while pressuring with a French press. For fractionating a cell membrane, a fractionating method by centrifugation force such as a fractionating centrifugation method and density gradient centrifugation method is mainly used. For example, a broken cell solution is centrifuged at a low speed (500 rpm-3000 rpm) for a shorter period of time (usually, about 1 minute to 10 minutes), the supernatant is centrifuged at a higher speed (15000 rpm-30000 rpm) usually for 30 minutes to 2 hours, and the resulting precipitate is used as a membrane fraction. An expressed receptor protein and membrane components such as cell-derived phospholipid and a membrane protein are contained at a large amount in the membrane fraction.

[0192] An amount of a receptor protein in a cell comprising the receptor protein or a membrane fraction is preferably 10^3 - 10^8 molecules, suitably 10^5 - 10^7 molecules per cell. In addition, as an expressed amount is larger, ligand binding activity per a membrane fraction (specific activity) becomes higher, and not only high sensitive screening system can be constructed but also a large amount of samples can be measured at the same lot.

[0193] In order to conduct the above methods (a) to (c) for screening a compound which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, a suitable receptor protein fraction and a labeled ligand are necessary.

[0194] As a receptor protein fraction, a natural receptor protein fraction or a recombinant receptor protein fraction having the equal activity thereto are desirable. Here, equal activity denotes equal ligand binding activity and signal information transmission action.

[0195] As a labeled ligand, a labeled ligand and a labeled ligand analog compound are used. For example, a ligand labeled with [^3H], [^{125}I], [^{14}C] or [^{35}S] is used.

[0196] More particularly, in order to conduct a method for screening a compound which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, first, an authentic receptor protein is prepared by suspending a cell comprising the present receptor protein and the like or a membrane fraction of the cell in a buffer suitable for screening. Any buffers which do not inhibit binding of a ligand with a receptor protein may be used such as phosphate buffer and Tris-hydrochloric acid buffer of pH 4-10 (desirably pH 6-8). In addition, in order to decrease non-specific binding, surfactants such as CHAPS, Tween-80TM (Kao-Atlas Company), digitonin, and deoxycholate may be added to a buffer. Further, in order to suppress degradation of a receptor and a ligand by a protease, a protease inhibiting agent such as PMSF, leupeptin, E-64 (manufactured by Peptide Laboratory) and pepstatin may be added. A ligand labeled with a constant amount (5000 cpm-500000 cpm) is added to 0.01 ml to 10 ml of the receptor solution and 10^{-4} M to 10^{-10} M of a test compound is present at the same time. In order to know an amount of non-specific binding (NSB), a reaction tube to which a largely excessive amount of an unlabeled test compound has been added is also prepared. The reaction is conducted at about 0 °C to 50 °C, preferably about 4 °C to 37 °C, for about 20 minutes to 24 hours, desirably about 30 minutes to 3 hours. After the reaction, the reaction is filtered with a glass fiber filtering paper, washed with a suitable amount of the same buffer, and the radioactivity remaining in a glass fiber filtering paper is measured by a scintillation counter or a γ -counter. A test compound having, for example, not greater than 50% of a specific binding amount (B-NSB) when a count (B_0 -NSB) obtained subtracting a non-specific binding amount (NSB) from a count (B_0) at no antagonizing substance is regarded as 100%, can be selected a candidate compound having the antagonism inhibiting

ability.

[0197] In order to conduct the above methods (d)-(e) for screening a compound which alters binding of a ligand with the present protein and the like, for example, the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a receptor protein can be measured by the known method or using a commercially available measuring kit.

[0198] More particularly, first, a cell comprising the present receptor protein and the like is cultured on a multiwellplate. Upon implementation of screening, a medium and a buffer are exchanged with a fresh medium or a suitable buffer showing no toxicity to a cell in advance, a test compound is added to incubate for a constant period of time, a cell is extracted or the supernatant is recovered, and the produced product is quantitated according to respective methods. When the production of a substance as an index for the cell stimulating activity (for example, arachidonic acid) is difficult to be assayed due to a degrading enzyme contained in a cell, an assay may be conducted by adding an inhibitor for the degrading enzyme. In addition, regarding the activity such as cAMP production inhibition, it can be detected as production inhibiting action to a cell for which a fundamental producing amount of a cell has been increased by forskolin.

[0199] In order to conduct screening by measuring the cell stimulating activity, a cell which has expressed a suitable receptor protein is necessary. As a cell which has expressed the present receptor protein, a cell strain having natural type present receptor protein and the like, and a cell which has expressed the aforementioned recombinant receptor protein and the like are desirable.

[0200] As a test compound, for example, a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound, a fermentation product, a cell extract, a plant extract and an animal tissue extract are used and these compounds may be a novel compound or the known compound.

[0201] A kit for screening a compound which alters binding of a ligand with the present receptor protein and the like, or a salt, contains a cell comprising the present receptor protein and the like, or a membrane fraction of a cell comprising the present receptor protein and the like.

[0202] An example of the present kit for screening is as follows:

1. Screening reagent

(a) Measuring buffer and washing buffer

Hanks' Balanced Salt Solution (manufactured by Gibco) with 0.05% bovine serum albumin (manufactured by Sigma) added.

The buffers may be sterile filtered with a filter of a pore size of $0.45\ \mu\text{m}$ and stored at $4\ ^\circ\text{C}$, or may be prepared upon use.

(b) Authentic G protein coupled receptor

CHO cells which have expressed the present receptor protein are passaged in a 12-well plate at 8×10^5 /well and cultured at $37\ ^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 and 95% air for 2 days.

(c) Labeled ligand

Ligand labeled with commercially available [^3H], [^{125}I], [^{14}C] or [^{35}S]. The ligand in the state of an aqueous solution is stored at $4\ ^\circ\text{C}$ or $-20\ ^\circ\text{C}$, and diluted with a measuring buffer to $1\ \mu\text{M}$ upon use.

(d) Ligand standard solution

A ligand is dissolved in PBS comprising 0.1% bovine serum albumin (manufactured by Sigma) to $1\ \text{mM}$ and stored at $-20\ ^\circ\text{C}$.

2. A measuring method

(a) CHO cells, expressing the present receptor protein, which were cultured on a 12-well tissue culturing plate, are washed with twice with 1 ml of a measuring buffer, and 490 μl measuring buffer is added to each well.

(b) 5 μl of a 10^{-3} to 10^{-10} M test compound is added, and 5 μl of a labeled ligand is added to react at room temperature for 1 hour. In order to know an amount of non-specific binding, 5 μl of a 10^{-3} M ligand is added in place of a test compound.

(c) The reaction solution is removed, and washed three times with 1 ml of a washing buffer. A labeled ligand bound to a cell is dissolved in 0.2N NaOH-1% SDS, and mixed with 4 ml of a liquid scintillator A (manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

(d) The radioactivity is measured using a liquid scintillation counter (manufactured by Beckmann) and Percent Maximum Binding (PMB) is obtained according to the following equation.

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: Value when a test compound is added

NSB: Non-specific Binding (an amount of non-specific binding)

B₀: Maximum binding amount

[0203] A compound obtained by using the present screening or method or screening kit, or a salt thereof, is a compound which has the activity of altering binding of a ligand with the present receptor protein and the like and, specifically, (a) a compound having the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca²⁺ release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a G protein coupled receptor (so called agonist for the present receptor protein), (b) a compound having no cell stimulating activity (so called antagonist for the present receptor protein), (c) a compound which enhances binding force of a ligand with the present G protein coupled receptor protein, or (d) a compound which decreases binding force of a ligand with the present G protein coupled receptor protein.

[0204] Examples of the compound include a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound and a fermentation product and these compounds may be a novel compound or the known compound.

[0205] Since an agonist for the present receptor protein and the like has the same activity as the physiological activity harbored by a ligand for the present receptor protein and the like, it is useful as a safe and low toxic medicine depending upon the ligand activity.

[0206] Since an antagonist for the present receptor protein and the like can suppress the physiological activity harbored by a ligand for the present receptor protein and the like, it is useful as a safe and low toxic medicine for suppressing the ligand activity.

[0207] A compound which enhances binding force of a ligand with the present G protein coupled receptor protein is useful as a safe and low toxic medicine for enhancing the physiological activity harbored by a ligand for the present receptor protein and the like.

[0208] A compound which decreases binding force of a ligand with the present G protein coupled receptor protein is useful as a safe and low toxic medicine for decreasing the physiological activity harbored by a ligand for the present receptor protein and the like.

[0209] When a compound obtained by using the present screening method or screening kit, a salt thereof is used as the aforementioned pharmaceutical composition, the use can be implemented according to the conventional means. For example, the compound can be formulated into tablets, capsules, elixirs, microcapsules, sterile solutions, and suspensions as in the aforementioned drug comprising the present receptor protein.

[0210] Since the thus obtained preparations are safe and low toxic, for example, they can be administered to a human being or a mammal (for example, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey).

[0211] A dose of the compound or a salt thereof is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, when orally administered, the dose is generally about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg per day, for example, in an adult (60 kg). When parenterally administered, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and administration method and it is advantageous to administer the compound by intravenous injection at an amount of around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg in the form of an injection, for example, in an adult (60 kg). In the case of other animals, an amount calculated per 60 kg can be administered.

(8) An agent for preventing and/or treating various diseases comprising a compound which alters binding of the present G protein coupled receptor protein with a ligand (agonist and antagonist)

[0212] The present receptor protein is considered to play some important role in the living body such as the central function as described above. Therefore, a compound which alters binding of the present receptor protein with the ligand (agonist and antagonist) can be used as an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient function of the present receptor protein.

[0213] When the compound is used as an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient function of the present receptor protein, it can be formulated into preparations according to the conventional means.

[0214] For example, the compound can be used orally as tablets coated with a sugar-coating if necessary, capsules, elixirs and microcapsules, or parenterally used as an injection such as sterile solutions with water or other pharmaceutically acceptable solution, or suspensions. For examples, the preparations may be produced by blending the com-

pound with the physiologically recognized known carriers, flavors, excipients, vehicles, antiseptics, stabilizers and binders in an unit dosage form required for generally recognized pharmacy. An amount of an ingredient in these preparations is such that a suitable volume in an indicated range can be obtained.

[0215] The additives which can be admixed with the tablets, capsules etc. include, for example, binders such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swelling agents such as corn starch, gelatin and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweeteners such as sucrose, lactose and saccharine, and flavors such as peppermint, akamono oil and cherry. When one capsule is in a unit form, liquid carriers such as fats and oils can be contained in the materials described above. The aseptic composition for injection can be formulated according to conventional pharmaceutical manufacturing by dissolving or suspending the active material and naturally occurring vegetable oils such as sesame oil and coconut oil in vehicles such as injection water. The aqueous solution for injection includes, for example, physiological saline or an isotonic solution containing glucose and other supplementary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride etc.), and may be used in combination with suitable solubilizer such as alcohols (e.g., ethanol etc.), polyalcohols (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol etc.) and nonionic surfactants (e.g., Polysorbate 80™, HCO-50 etc.). The oily solution includes, for example, sesame oil, soybean oil etc., and may be used in combination with solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol etc.

[0216] In addition, the above preventing or treating agent may be blended, for example, with the buffer (e.g., phosphate buffer, sodium acetate buffer etc.), soothing agents (e.g., benzalkonium chloride, procaine hydrochloride etc.), stabilizers (e.g., human serum albumin, polyethylene glycol etc.), preservatives (e.g., benzyl alcohol, phenol etc.), antioxidants etc. Usually, the prepared injection is introduced into suitable ampoules.

[0217] Since the thus obtained preparations are safe and low toxic, for example, they can be administered to a human being or a mammal (for example, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey).

[0218] A dose of the compound or a salt thereof is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, orally administered, the dose is generally about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg per day, for example, in an adult (60 kg). When the compound is administered parenterally, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, for example, it is advantageous to administer the compound by intravenous injection at an amount of around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg per day in the form of an injection, for example, in an adult (60 kg). In the case of other animals, an amount calculated per 60 kg can be administered.

(9) Quantitation of the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof

[0219] Since the present antibody can specifically recognize the present receptor protein and the like, it can be used for quantitating the present receptor protein and the like in a test solution, in particular, for quantitation by a sandwich immunoassay. That is, the present invention provides, for example, (i) a method for quantitating the present receptor protein and the like in a test solution, which comprises competitively reacting the present antibody with a test solution and labeled receptor protein and the like, and measuring a proportion of the labeled receptor protein and the like bound to the antibody, (ii) a method for quantitating the present receptor protein and the like in a test solution, which comprises reacting simultaneously or continuously a test solution with the present antibody insolubilized on a carrier and the labeled present antibody, and measuring the activity of a labeling agent on a insolubilized carrier.

[0220] In the above (ii), it is preferable that one antibody is an antibody which recognizes a N-terminal of the present receptor protein and the like, and the other antibody is an antibody which reacts with a C-terminal of the present receptor protein and the like.

[0221] By using a monoclonal antibody to the present receptor protein and the like (hereinafter referred to as present monoclonal antibody in some cases), measurement of the present receptor protein can be conducted and, additionally, detection with tissue staining can be conducted. For these objects, an antibody molecule itself may be used, or a F (ab')₂ fraction, a Fab' fraction or a Fab fraction may be used. A method for measuring an antibody to the present receptor protein is not particularly limited but any measuring methods may be used as long as they are a method for measuring by detecting an amount of an antibody, an antigen or a antibody-antigen complex corresponding to an amount of an antigen in a test solution (for example, an amount of a receptor protein) by the chemical or physical means, and calculating this from a standard curve made using a standard solution comprising the known amount of an antigen. For example, nephrometry, a competition method, an immunometric method and a sandwich method are suitably used and, in respect of sensitivity and specificity, it is particularly preferable to use the sandwich method described later.

[0222] As a labeling agent used in a measuring method using a labeling substance, for example, a radioactive isotope, an enzyme, a fluorogenic substance and a chromogenic substance are used. As the radioactive isotope, for example, [¹²⁵I], [¹³¹I], [³H] and [¹⁴C] are used. As the above enzyme, enzymes which are safe and have the larger specific activity are preferable. For example, β-galactosidase, β-glucosidase, alkaline phosphatase, peroxidase and malic acid dehy-

drogenase are used. As the fluorogenic substance, for example, fluorescamine and fluorescein isothiocyanate are used. As the chromogenic substance, for example, luminol, luminol derivative, luciferin, and lucigenin are used. Further, biotin-avidin system may be used for binding an antibody or an antigen with a labeling agent.

[0223] Upon insolubilization of an antigen or an antibody, physical adsorption may be used. Alternatively, chemical binding usually used for insolubilizing or fixing proteins or enzymes may be used. As the carrier, for example, insoluble polysaccharides, such as agarose, dextran and cellulose, synthetic resins such as polystyrene, polyacrylamide and silicone, or glasses are used.

[0224] In the sandwich method, an amount of the present receptor protein in a test solution can be quantitated by reacting a test solution with the insolubilized present monoclonal antibody (primary reaction), reacting with the labeled present monoclonal antibody (secondary reaction), and measuring the activity of a labeling agent on an insolubilized carrier. The primary reaction and the secondary reaction may be conducted in the reverse order, or simultaneously or at different times. A labeling agent and a method for insolubilization may be according to those described above.

[0225] In an immunoassay via sandwich method, an antibody used for a solid phase antibody or a labeling antibody is not necessarily one kind but a mixture of two or more kinds of antibodies may be used for the purpose of improving the measuring sensitivity.

[0226] In a method for measuring a receptor protein and the like by the present sandwich method, as the present monoclonal antibody used in the primary reaction and the secondary reaction, antibodies having different parts binding to the receptor protein and the like are preferably used. That is regarding antibodies used for the primary reaction and the secondary reaction, for example, when an antibody used for the secondary reaction recognizes a C-terminal of a receptor protein, as an antibody used in the primary reaction, an antibody which recognizes a part other than C-terminal, for example, a N-terminal is preferably used.

[0227] The present monoclonal antibody can be used, for example, in a nephrometry, competition method, an immunometric method or nephrometry. In the competition method, after an antigen in the test solution and a labeled antigen are competitively reacted with an antibody, an unreacted labeled antigen (F) and a labeled antigen bound to an antibody (B) are separated (B-F separation), an amount of either of labeled B or F is measured to quantitate an amount of an antigen in a test solution. In the present reaction method, a solution method using a soluble antibody as an antibody, using polyethylene glycol in B/F separation and using a solid phased antibody as the primary antibody, and a solid method using a solid phased antibody as the primary antibody, or using a soluble antibody as the primary antibody and a solid phased antibody as the secondary antibody, are used.

[0228] In the immunometric method, an antigen in a test solution and a solid phased antigen are competitively reacted with a constant amount of a labeled antibody and, thereafter, a solid phase and a solution phase are separated, or an antigen in a test solution and an excessive amount of a labeled antibody are reacted and a solid phased antigen is added thereto to bind an unreacted labeled antibody to a solid phase and, thereafter, a solid phase and a solution phase are separated.

[0229] In addition, in nephrometry, an amount of an insoluble precipitate produced as a result of an antigen-antibody reaction in a gel or a solution, is measured. Even when an amount of an antigen in a test solution is small and only a small amount of a precipitate is obtained, the laser nephrometry utilizing laser scattering is suitably used.

[0230] When these individual immunoassays are applied to the present invention, setting of the particular conditions and operations are not required. A system for measuring the present receptor protein or a salt thereof may be constructed by adding the normal technical consideration of a person skilled in the art to the normal conditions and operations in respective methods. For the details of these general technical means, one can see reviews and books [for example, see "Radioimmunoassay" ed. by Hiroshi Irie (Kodansha, published by 1974), "Radioimmunoassay, a second series" ed. by Hiroshi Irie (Kodansha, published in 1979), "Enzyme immunoassay" ed. by Eigi Ishikawa (Igakushoin, published in 1978), "Enzyme immunoassay" (2nd edition) ed. by Eigi Ishikawa (Igakushoin, published in 1982), "Enzyme immunoassay" (3rd edition) ed. by Eigi Ishikawa (Igakushoin, published in 1987), (Methods in ENZYMOLOGY) Vol.70 (Immunochemical Techniques (Part A)), ibid. Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), ibid. Vol.74 (Immunochemical Techniques (Part C)), ibid. Vol.84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), ibid. Vol.92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), ibid. Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (published by Academic Press)].

[0231] The present receptor protein or a salt thereof can be quantitated with better sensitivity by using the present antibody as described above.

[0232] Further, various diseases associated with the deficient functions of the present receptor protein can be diagnosed by quantitating the present receptor protein or a salt thereof in the living body by using the antibody.

[0233] In addition, the present antibody can be used for specifically detecting the present receptor protein and the like present in a specimen such as body fluid and tissues. In addition, the present antibody can be used for preparing an antibody column used for purifying the present receptor protein and the like, detecting the present receptor protein and the like in each fraction upon purification, and analyzing the behavior of the present receptor protein in a test-cell.

(10) A method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane

[0234] Since the present antibody can recognize the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, it can be used for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane.

[0235] That is, the present invention provides for example:

(i) a method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a salt thereof in a cell membrane, by rupturing tissues or cell isolated from (a) blood, (b) particular organ, or (c) tissues or an organ of a non-human mammal, isolating a cell membrane fraction, and quantitating the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction,

(ii) a method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane, by rupturing a transformant and the like expressing the present receptor protein or a partial peptide thereof, isolating a cell membrane fraction, and quantitating the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction,

(iii) a method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane, by preparing tissues or cells isolated from (a) blood, (b) particular organ, or (c) an organ of a non-human mammal into sections, and quantitating a degree of staining of a receptor protein on a cell superficial layer by an immunostaining method to confirm the protein on a cell membrane,

(iv) a method for screening a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof, by preparing a transformant and the like expressing the present receptor protein or a partial peptide thereof into sections, and quantitating a degree of staining of the receptor protein on a cell superficial layer by an immunostaining method to confirm the protein on a cell membrane.

[0236] Quantitation of the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction is conducted as follows:

(i) a drug (for example, anti-dementia drug, blood pressure decreasing drug, anti-cancer agent and anti-obesity drug) or a physical stress (for example, inundation stress, electric shock, light and dark, and low temperature) is given to a normal or disease model non-human mammal (for example, mouse, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey and, more particularly, dementia rat, obesity mouse, arterial sclerosis rabbit and cancer carrying mouse) and, after a constant time has passed, isolated tissues or cells are obtained from blood, or particular organ (for example, brain, liver and kidney), or an organ. The resulting organs, tissues or cells are suspended in a suitable buffer (for example, Tris-hydrochloric acid buffer, phosphate buffer and Hepes buffer), organs, tissues and cell are ruptured, and subjected to procedures such as centrifugation, filtration and column fractionation using surfactants (for example, Triton X100™ and Tween 20™) to obtain a cell membrane fraction.

A cell membrane fraction refers to a fraction which contains a large amount of a cell membrane obtained by the per se known method, after rupture of a cell. As a method for breaking a cell, there are a method for squeezing a cell with a Potter-Elvehjem type homogenizer, breakage with a Waring Blener and Poltron (manufactured by Kinematica), breakage by ultrasound, and breakage by jetting a cell through a thin nozzle while pressuring with a French press. For fractionating a cell membrane, a fractionating method by centrifugal force such as a fractionating centrifugation separating method and a density gradient centrifugation separating method is mainly used. For example, the broken cell solution is centrifuged at a low speed (500 rpm to 3000 rpm) for a shorter period of time (usually, about 1 minute to 10 minutes), the supernatant is further centrifuged at a high speed (15000 rpm to 30000 rpm) usually for 30 minutes to 2 hours, and the resulting precipitate is used as a membrane fraction. The expressed receptor protein and the like as well as phospholipid derived from a cell and a membrane component such as a membrane protein are contained at a large amount in the membrane fraction.

The present receptor protein or a salt thereof contained in a cell membrane fraction can be quantitated, for example, by a sandwich immunoassay using the present antibody or a Western blot analysis.

Such the sandwich immunoassay can be conducted as the aforementioned method, and Western blot can be conducted by the means known per se.

(ii) a transformant expressing the present receptor protein or a partial peptide thereof is prepared according to the aforementioned method, and the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction can be quantitated.

[0237] Screening of a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane can be conducted by

(i) administering a test compound to a normal or a disease model non-human mammal a constant period of time before impartation of a drug or a physical stress (30 minutes before to 24 hours before, preferably 30 minutes before to 12 hours before, more preferably 1 hour before to 6 hours before), or a constant period of time after (30 minutes after to 3 days after, preferably 1 hour after to 2 days after, more preferably 1 hour after to 24 hours after), or simultaneously with a drug or a physical stress and, after a constant period of time has passed after administration (30 minutes after to 3 days after, preferably 1 hour after to 2 days after, more preferably 1 hour after to 24 hours after), quantitating an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane, and can be conducted by

(ii) mixing a test compound into a medium upon culturing of a transformant according to the conventional method and, after cultured for a constant period of time (1 day after to 7 days after, preferably 1 day after 3 days after, more preferably 2 days after to 3 days after, quantitating an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane.

More particularly, confirmation of the present receptor protein or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction can be conducted as follows:

(iii) a drug (for example, anti-dementia drug, blood pressure decreasing drug, anti-cancer agent and anti-obesity drug) or a physical stress (for example, inundation stress, electric shock, light and dark and low temperature) is given to a normal or disease model non-human mammal (for example, mouse, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey and, more particularly, dementia rat, obesity mouse, arterial sclerosis rabbit and cancer carrying mouse) and, after a constant period of time has passed, tissues or cells isolated from blood, or particular organ (for example, brain, liver and kidney), or an organ are obtained. The resulting organ, tissues or cells are prepared into tissue sections according to the conventional method, and immunostaining is conducted using the present antibody. An amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane can be confirmed quantitatively or qualitatively by quantitating a degree of staining of the receptor protein on a cell superficial layer to confirm the protein on a cell membrane.

(iv) confirmation can be also conducted by the similar means using a transformant expressing the present receptor protein or a partial peptide thereof.

[0238] A compound obtained by the present screening method or a salt thereof is a compound which has the activity of altering an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane and, more particularly, (a) a compound which enhances the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via a G protein coupled receptor by increasing an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane, and (b) a compound which reduces the cell stimulating activity by decreasing an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane.

[0239] Examples of the compound include a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound and fermentation product and these compounds may be a novel compound or the known compound.

[0240] A compound which enhances the cell stimulating activity is useful as a safe and low toxic medicine for enhancing the physiological activity of the present receptor protein.

[0241] A compound which reduces the cell stimulating activity is useful as a safe and low toxic medicine for decreasing the physiological activity of the present receptor protein and the like.

[0242] When a compound obtained by the screening method or a salt thereof is used as a pharmaceutical composition, the use thereof can be implemented according to the conventional means. For example, it can be formulated into tablets, capsules, elixirs, microcapsules, sterile solutions or suspensions as in the aforementioned drug comprising the present receptor protein.

[0243] Since the thus obtained preparations are safe and low toxic, for example, they can be administered to a human being or a mammal (for example, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey).

[0244] A dose of the compound or a salt thereof is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, when orally administered, the dose is generally about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg; more preferably about 1.0 to 20 mg per day, for example, in an adult (60 kg). When parenterally administered, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, for example, it is advantageous to administer the compound by intravenous injection at an amount of around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg per day in the form of an injection, for example, in an adult (60 kg). In the case of other animals, an amount calculated per 60 kg can be administered.

(11) An agent for preventing and/or treating various diseases comprising a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane

[0245] The present receptor protein is considered to play some important role in the living body such as the central function as described above. Therefore, a compound which alters an amount of the present receptor protein or a partial peptide thereof in a cell membrane can be used as an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient functions of the present receptor protein.

[0246] When the compound is used as an agent for preventing and/or treating diseases associated with the deficient functions of the present receptor protein, it can be formulated into preparations according to the conventional means.

[0247] For example, the compound can be used orally as tablets coated with a sugar-coating if necessary, capsules, elixirs or microcapsules, or parenterally as injections such as sterile solutions with water or other pharmaceutically acceptable solutions and suspensions. For example, preparations may be produced by blending the compound together with physiologically recognized known carriers, flavors, excipients, vehicles, antiseptics, stabilizers or binders in an unit dosage form required for the generally recognized pharmacy. An amount of an active ingredient in these preparations is such that a suitable volume in an indicated range can be obtained.

[0248] The additives which can be admixed with the tablets, capsules etc. include, for example, binders such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swelling agents such as corn starch, gelatin and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweeteners such as sucrose, lactose and saccharine, and flavors such as peppermint, akamono oil and cherry. When one capsule is in a unit form, liquid carriers such as fats and oils can be contained in the materials described above. The aseptic composition for injection can be formulated according to conventional pharmaceutical manufacturing by dissolving or suspending the active material and naturally occurring vegetable oils such as sesame oil and coconut oil in vehicles such as injection water. The aqueous solution for injection includes, for example, physiological saline or an isotonic solution containing glucose and other supplementary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride etc.), and may be used in combination with suitable solubilizer such as alcohols (e.g., ethanol etc.), polyalcohols (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol etc.) and nonionic surfactants (e.g., Polysorbate 80™, HCO-50 etc.). The oily solution includes, for example, sesame oil, soybean oil etc., and may be used in combination with solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol etc.

[0249] Since the thus obtained preparations are safe and low toxic, for example, they can be administered to a human being or a mammal (for example, rat, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey).

[0250] A dose of the compound or a salt thereof is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, when orally administered, the dose is generally about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg per day, for example, in an adult (60 kg). When administered parenterally, one time dose is different depending upon an administration subject, a subject organ, symptom and an administration method and, for example, it is advantageous to administer the compound by intravenous injection at an amount of around about 0.01 to 30 mg, preferably around about 0.1 to 20 mg, more preferably around about 0.1 to 10 mg in the form of an injection, for example, in an adult (60 kg). In the case of other animals, an amount calculated per 60 can be administered.

(12) Neutralization with an antibody to the present receptor protein, a partial peptide thereof or a salt thereof

[0251] Neutralizing activity of an antibody to the present receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, relative to the receptor protein and the like means the activity of inactivating the signal transmission functions associated with the receptor protein. Therefore, when the antibody has the neutralizing activity, the signal transmission associated with the receptor protein, for example, the cell stimulating activity (for example, the activity promoting or inhibiting arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential fluctuation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, and reduction of pH) via the receptor protein can be inactivated. Therefore, the antibody can be used for preventing and/or treating diseases caused by excess expression of the receptor protein.

(13) Production of a non-human animal having a DNA encoding the present G protein coupled receptor protein

[0252] A transgenic non-human animal expressing the present receptor protein and the like can be produced using the present DNA. Examples of the non-human animal include a mammal (for example, rat, mouse, rabbit, sheep, pig, cow, cat, dog and monkey)(hereinafter, abbreviated as animal in some cases) and, in particular, a mouse and a rabbit are suitable.

[0253] When the present DNA is transferred into a subject animal, it is generally advantageous to use a gene the DNA as a gene construct bound to downstream of a promoter which can express can be expressed in an animal cell. For example, when the present DNA derived from a rabbit is transferred, a DNA transferred animal producing th

present receptor protein and the like at a large amount can be produced by micro-injecting a gene construct bound to downstream of various promoters which can express the present DNA derived from an animal having the high homology therewith in an animal cell, into a rabbit fertilized egg. Although as this promoter, for example, ubiquitous expression promoters such as a virus-derived promoter and a metallothionein promoter can be used, preferably, the NGF gene promoter and the enolase gene promoter which are specifically expressed in a brain are used.

[0254] Transference of the present DNA at a fertilized egg cell stage is maintained such that it is present in all germ cells and somatic cells in a subject animal. The fact that the present receptor protein and the like is present in germ cells of the produced animal after DNA transference means that all offsprings of the produced animal have the present receptor protein and the like in all of their germ cells and somatic cells. Offsprings of this kind of animal which inheritate a gene have the present receptor protein and the like in all their germ cells and somatic cells.

[0255] The present DNA transferred animal can be rear-passaged under the normal rearing environment as the DNA harboring animal by confirming that a gene is stably retained by mating.

[0256] Further, a homozygote animal harboring a transferred gene in both homologous chromosomes is obtained by mating a female and a male of an animal harboring a DNA of interest, and a female and a male of this animal can be mated to propagation-passage so that all offsprings have the DNA.

[0257] Since an animal with the present DNA transferred highly expresses the present receptor protein and the like, it is useful as an animal for screening an agonist or an antagonist for the present receptor protein and the like.

[0258] The present DNA transferred animal can be also used as a cell source for tissue culturing. For example, the present receptor protein and the like can be analyzed by analyzing directly a DNA or a RNA in tissues in the present DNA transferred mouse, or analyzing tissues in which the present receptor protein expressed by a gene is present. Cells of tissues having the present receptor protein and the like is cultured by the standard tissue culturing techniques and, by using them, the functions of cells from tissues which are generally difficult to culture such as a brain and peripheral tissues can be studied. In addition, by using the cells, for example, selection of medicines which enhance the functions of various tissues is possible. In addition, when there is a highly expressing cell strain, the present receptor protein and the like can be isolated and purified therefrom.

[0259] When bases and amino acids are indicated by abbreviations, they are based on abbreviations by IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature or the conventional abbreviations in the art and examples thereof are shown below. In addition, when an optical isomer can be present regarding an amino acid, a L amino acid is indicated unless expressly indicated.

DNA :	deoxyribonucleic acid
cDNA :	complementary deoxyribonucleic acid
A :	adenine
T :	thymine
G :	guanine
C :	cytosine
RNA :	ribonucleic acid
mRNA :	messenger ribonucleic acid
dATP :	deoxyadenosine triphosphate
dTTP :	deoxythymidine triphosphate
dGTP :	deoxyguanosine triphosphate
dCTP :	deoxycytidine triphosphate
ATP :	adenosine triphosphate
EDTA :	ethylenediamine tetraacetic acid
SDS :	sodium dodecylsulfate
Gly :	glycine
Ala :	alanine
Val :	valine
Leu :	leucine
Ile :	isoleucine
Ser :	serine
Thr :	threonine
Cys :	cysteine
Met :	methionine
Glu :	glutamic acid
Asp :	aspartic acid
Lys :	lysine
Arg :	arginine

His : histidine
 Phe : phenylalanine
 Tyr : tyrosine
 Trp : tryptophan
 5 Pro : proline
 Asn : asparagine
 Gln : glutamine
 pGlu : pyroglutamic acid
 Me : methyl group
 10 Et : ethyl group
 Bu : butyl group
 Ph : phenyl group
 TC : thiazolidine-4(R)-carboxamide group

15 **[0260]** In addition, substituents, protecting groups and reagents which are frequently used are described by the following symbols.

Tos : p-toluenesulfonyl
 CHO : formyl
 20 Bzl : benzyl
 Cl₂Bzl : 2,6-dichlorobenzyl
 Bom : benzyloxymethyl
 Z : benzyloxycarbonyl
 Cl-Z : 2-chlorobenzyloxycarbonyl
 25 Br-Z : 2-bromobenzyloxycarbonyl
 Boc : t-butoxycarbonyl
 DNP : dinitrophenol
 Trt : trityl
 Bum : t-butoxymethyl
 30 Fmoc : N-9-fluorenylmethoxycarbonyl
 HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
 HOObt : 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
 HONB : 1-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide
 DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

35 **[0261]** SEQ ID Nos. of Sequence Listing of the present specification indicate the following sequences:

[SEQ ID No:1] shows an amino acid sequence of the present human-derived novel G protein coupled receptor protein hHI7T213.

40 [SEQ ID No:2] shows an amino acid sequence of the present human-derived novel G protein coupled receptor protein hHI7T213V.

[SEQ ID No:3] shows a base sequence of a cDNA encoding the present human-derived novel G protein coupled receptor protein hHI7T213 having an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1.

45 [SEQ ID No:4] shows a base sequence of a cDNA encoding the present human-derived novel G protein coupled receptor protein hHI7T213V having an amino acid sequence represented by SEQ ID No:2.

[SEQ ID No:5] shows a base sequence of a primer 1 used for cloning a cDNA encoding the present human-derived novel G protein coupled receptor protein hHI7T213.

[SEQ ID No:6] shows a base sequence of a primer 2 used for cloning a cDNA encoding the present human-derived novel G protein coupled receptor protein hHI7T213.

50 **[0262]** A transformant *Escherichia coli* DH5 α /pCRII-hHI7T213 obtained in Example 1 below has been deposited at National Institute of Bioscience and Human-Technology (NIBH), Agency of Industrial Science & Technology, Ministry of International Trade & Industry as an accession number FERM BP-6484 since September 4, 1998, and at Institute for Fermentation, Osaka, Japan (IFO) as an accession number of IFO 16187 since June 19, 1998.

55 **[0263]** The following Examples illustrate the present invention in more detail but do not limit the scope of the present invention. Genetic procedures using *Escherichia coli* were according to a method described in Molecular cloning.

Example 1

Cloning of, and determination of a base sequence of a cDNA encoding a human-derived G protein coupled receptor protein

[0264] A PCR reaction was performed using a human hippocampus cDNA (Marathon-ready™ cDNA, CLONTECH) as a template and using 2 primers. primer 1 (SEQ ID No:5) and primer 2 (SEQ ID No:6). Regarding the composition of a reaction solution in the reaction, a 1/10 amount of the cDNA was used as a template, and a 1/50 amount of Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH), each 0.2 μM of primer 1 (SEQ ID No:5) and primer 2 (SEQ ID No:6), 200 μM dNTPs, and a buffer affixed to an enzyme were added to a solution amount of 25 μl. In the PCR reaction, (a) after 95 °C for 1 minute, (b) a cycle of 94 °C for 20 seconds and 72 °C for 2 minutes was repeated three times, (c) a cycle of 94 °C for 20 seconds and 68 °C for 2 minutes was repeated three times, (d) a cycle of 94 °C for 20 seconds, 63.5 °C for 20 seconds and 68 °C for 2 minutes and 20 seconds was repeated 38 times and, (e) finally, an elongation reaction was performed at 68 °C for 7 minutes. The reaction product after the PCR reaction was subcloned into the plasmid vector pCRII (Invitrogen) according to the formulation of the TA cloning kit (Invitrogen). This was introduced Escherichia coli DH5α, clones having the cDNA were selected on a LB agar medium comprising ampicillin, sequences of individual clones were analyzed and, as a result, 2 kinds of cDNA sequences (SEQ ID No:3 and SEQ ID No:4) encoding a novel G protein coupled receptor protein were obtained. Among amino acid sequences (SEQ ID No:1 and SEQ ID No:2) derived from these cDNAs, a novel G protein coupled receptor protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 was named as hHI7T213, and a novel G protein coupled receptor protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID No:2 was named as hHI7T213V.

[0265] The plasmid pCRII-hHI7T213 in which a cDNA (SEQ ID No:3) encoding the present human hippocampus-derived G protein coupled receptor protein hHI7T213 had been subcloned, was introduced Escherichia coli DH5α according to the per se known method to obtain a transformant: Escherichia coli DH5α/pCRII-hHI7T213.

Example 2

Preparation of CHO cells expressing hHI7T213

[0266] After the transformant E. coli DH5α/pCRII-hHI7T213 prepared in Example 1 was cultured, a plasmid DNA of pCRII-hHI7T213 was prepared using a plasmid mid kit (Quiagen). A cDNA encoding the present G protein coupled receptor protein hHI7T213 was cloned into the plasmid vector pCDNA3.1/V5/His for protein expression from this plasmid, to construct the plasmid pcDNA3.1-hHI7T213 for protein expression. After a large amount of plasmid DNA was prepared using a plasmid mid kit (Quiagen), the thus obtained plasmid was introduced CHO dhfr cells using the Cellfect Transfection Kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the attached protocol. That is, 10 mg of DNA was prepared into a coprecipitated suspension with calcium phosphate, which was added to a 10 cm laboratory dish on which 5x10⁵ or 1x10⁶ CHO dhfr cells had been seeded 24 hours before, cultured on the MEMα medium comprising 10% bovine fetal serum for 1 day and passaged, and cultured on the MEMα medium, which is a selection medium, comprising 0.4 mg/ml G418 (Gibco BRL) and 10% dialyzed bovine fetal serum. By selection of a colony of a transformant cell (CHO/hHI7T213) growing in the selection medium, hHI7T213 expressing CHO cells were obtained.

[0267] The total RNA was extracted from the selected hHI7T213 expressing CHO cells according to the conventional method, an amount of a mRNA of hHI7T213 was measured and a copy number was calculated by a TaqMan method. The results are shown in the following table.

Table 1

Clone No.	Expression amount (copy/ng total RNA)	
	First measurement	Second measurement
8	4780	8145
	10916	8956
12	44105	67482
	47085	65845
13	16663	20810
	18033	20404

Industrial applicability

[0268] The present G protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof and a polynucleotide (for example, DNA, RNA and its derivative) encoding the receptor protein or a partial peptide thereof can be used for (a) determination of a ligand (agonist), (b) obtaining of an antibody and anti-serum, (c) construction of expression system for a recombinant receptor protein, (d) development of a receptor binding assay system and screening of a drug candidate compound using the same expression system, (e) implementation of drug design based on comparison with a structurally analogous ligand or receptor, (f) reagent for making a probe and a PCR primer in gene diagnosis, (g) production of a transgenic animal, or medicine such as a gene preventing or treating agent.

Claims

1. A G protein coupled receptor protein which comprises an amino acid sequence identical or substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 or a salt thereof.
2. The G protein coupled receptor protein according to claim 1, wherein the amino acid sequence substantially identical to an amino acid sequence represented by SEQ ID No:1 is an amino acid sequence represented by SEQ ID No:2 or a salt thereof.
3. A partial peptide of the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or a salt thereof.
4. A polynucleotide which comprises a polynucleotide having a base sequence encoding the G protein coupled receptor protein according to claim 1.
5. The polynucleotide according to claim 4, which is a DNA.
6. The polynucleotide according to claim 4, which has a base sequence represented by SEQ ID No:3 or SEQ ID.No:4.
7. A recombinant vector which comprises the polynucleotide according to claim 4.
8. A transformant transformed with the recombinant vector according to claim 7.
9. A method for producing the G protein coupled receptor protein or a salt thereof, which comprises culturing a transformant according to claim 8 to produce the G protein coupled receptor protein according to claim 1.
10. An antibody to the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or the partial peptide according to claim 3 or a salt thereof.
11. The antibody according to claim 10, which is a neutralizing antibody which inactivates signal transmission of the G protein coupled receptor protein according to claim 1.
12. A diagnostic agent which comprises the antibody according to claim 10.
13. A ligand for the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or a salt thereof, which is obtainable by using the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or the partial peptide according to claim 3 or a salt thereof.
14. A medicine which comprises the ligand for the G protein coupled receptor protein according to claim 13.
15. A method for determining a ligand for the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or a salt thereof, which comprises using the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or the partial peptide according to claim 3 or a salt thereof.
16. A method for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein according to claim 1, or a salt thereof, which comprises using the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or the partial peptide according to claim 3 or a salt thereof.

17. A kit for screening a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to claim 1, or a salt thereof, which comprises the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or the partial peptide according to claim 3 or a salt thereof.
- 5 18. A compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to claim 1 or a salt thereof, which is obtainable by using the method for screening according to claim 16 or the kit for screening according to claim 17.
- 10 19. A medicine which comprises a compound which alters binding of a ligand with the G protein coupled receptor protein or a salt thereof according to claim 1, or a salt thereof, which is obtainable by the method for screening according to claim 16 or the kit for screening according to claim 17.
20. A polynucleotide which hybridizes with the polynucleotide according to claim 4 under the highly stringent conditions.
- 15 21. A polynucleotide which comprises a base sequence complementary to the polynucleotide according to claim 4 or a part thereof.
- 20 22. A method for quantitating a mRNA for the G protein coupled receptor protein according to claim 1, which comprises using the polynucleotide according to claim 4 or a part thereof.
23. A method for quantitating the G protein coupled receptor protein according to claim 1, which comprises using the antibody according to claim 10.
- 25 24. A method for diagnosing diseases associated with the function of the G protein coupled receptor according to claim 1, which comprises using the quantitating method according to claim 22 or claim 23.
25. A method for screening a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor according to claim 1 to be expressed, or a salt thereof, which comprises using the method for quantitating according to claim 22.
- 30 26. A method for screening a compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or a salt thereof in a cell membrane, which comprises using the method for quantitating according to claim 23.
- 35 27. A compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or a salt thereof, which is obtainable by using the method for screening according to claim 25.
- 40 28. A compound which alters an amount of the G protein coupled receptor protein according to claim 1 or a salt thereof in a cell membrane, which is obtainable by using the method for screening according to claim 26.

40

45

50

55

FIG. 1

Parameter : Kyte & Doolittle
Range to Average : 15

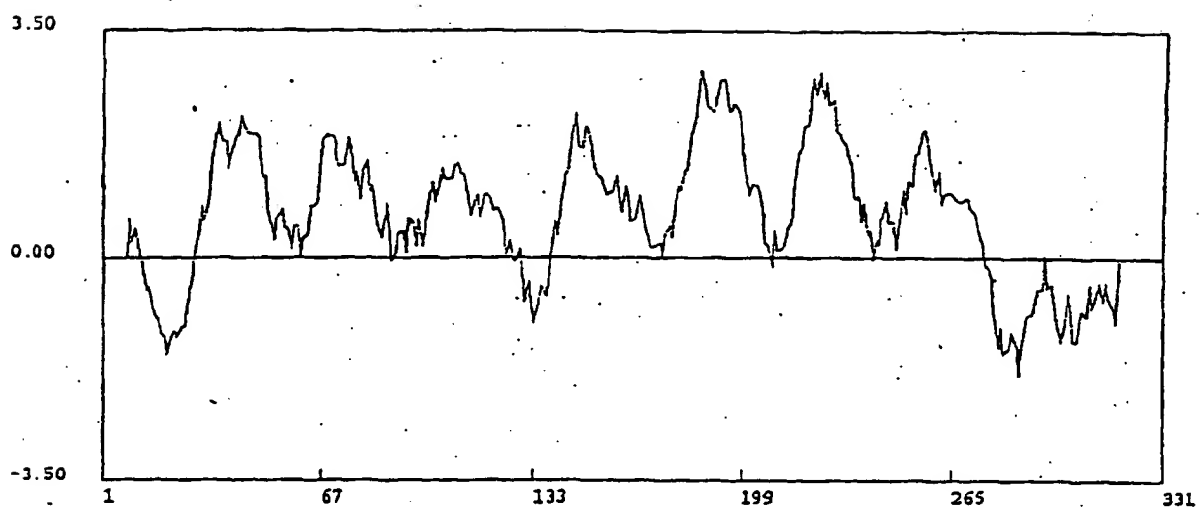


FIG. 2

```

37 VSLVALTGNAVVLWLLGCRMRRNAVSIY|LNLVAADFLLSGHI|CS... 83
   :| :::: |::||:| |||| :|| :| ||: :| :| |
41 ISPLGFVENGILLWFLCFMRRRNPFTVY|ITHLS|AD|SLLFC|FILSIDY 90

   .
84 .. PLRL|N|IRHP|SKILSPVMTFPYF|GLSMLS|A|STERCLS|LWPIWYH 131
   :| : : : || : : | | || :|::||::||::||::||::|
91 ALDYELSSGHYYT|VTL|SVTFLFGYNTGLYLLTA|SVERCLSVLYPIWYR 140

   .
132 CRRPRYLSSYMCVLLWALSLLRS|LEWMFCDFLFGADSVWCETSD... 177
   |::|:: | : :|::||| | : :|::| : || :| : ||
141 CHRPKHQSAFVCALLWALSCLVTTMEYVMC...|DSGEES...HSQSDCRAV 186

   .
178 .. FITI.AWLVFLCVVLCGSSVLLVRI|CGSRKMPLTRLYVT|ILLTVLV 224
   - ||:| :::|| :::| || :|:|:| :: :||::|::|::|::|
187 IIFIA|LSFLVFTPLMLV.SSTILVVKIRKNTWASHSSKLY|VIMVT||| 235

   .
225 FLLCGLPFGI|QWALFSRI|HLDWKVLFCHVHLVS|FLSALNSSANPI|YFF 274
   ||: :::| : : | : : |::| :::| :::|::|::|::|::|::|
236 FLIFAMP|MRVLYLLYYEY...WST.FGNLHN|SLLFST|NSSANPFIYFF 281

   .
275 VGSFRQRQNRQNLKLVLRALQD..TPEVDEGGG 306
   ||| :::: |::||:| ||::| | : :||:|
282 VGSSKKKRFRESLKVVLTRAFKDEMQRPRREQNG 315

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl ⁶ C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl ⁶ C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-146192, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 02 June, 1998 (02.06.98) & WO, 9724436, A2 & EP, 870020, A2	1-28
A	JP, 9-278798, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 October, 1997 (28.10.97) & EP, 789076, A2	1-28
A	JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 September, 1997 (16.09.97) (Family: none)	1-28
A	JP, 9-70289, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 18 March, 1997 (18.03.97) (Family: none)	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December, 1999 (10.12.99)		Date of mailing of the international search report 21 December, 1999 (21.12.99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

